



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی مورد، زردچوبه، درمنه کوهی، آویشن

شیرازی، سرخارگل و فلفل سیاه در **Invitro**

استاد راهنما

دکتر مهرزاد سرائی صحنه سرائی

اساتید مشاور

دکتر حسن جهانی هاشمی

دکتر رضا حاجی آقائی

دکتر عباس آزادمهر

نگارش : فرزانه جوادی مرند

سال تحصیلی : ۹۳-۹۴

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

چکیده فارسی

اهداف:

دستیابی به یک فراورده ی ضد توکسوپلازما با اثر بخشی بالا و اثرات جانبی کم از اولویت های تحقیقاتی توکسوپلازما است. فراورده های گیاهی ممکن است یک گزینه ی مناسبی برای این هدف باشند. مطالعه حاضر برای ارزیابی اثرات ضد توکسوپلازمایی عصاره های مورد، درمنه کوهی، آویشن شیرازی، زردچوبه، سرخارگل و فلفل در *invitro* انجام شد.

مواد و روش کار:

تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما، با این عصاره ها هم در محیط کشت عاری از سلول و هم در کشت سلول مجاورت داده شدند. میزان مرگ و میر تاکی زوئیت ها در محیط عاری از سلول در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. EC50 عصاره ها در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از MTT و الایزایدر تعیین گردید. پریمتامین به عنوان کنترل استفاده شد.

نتایج با استفاده از آزمون یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی توکی با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز شد.

نتایج:

تمامی عصاره ها در محیط عاری از سلول اثرات کشندگی روی تاکی زوئیت ها نشان دادند. بیشترین اثر مربوط به سرخارگل، مورد و درمنه کوهی بود. عصاره فلفل کمترین مورتالیتی را روی توکسوپلازما نشان داد.

سرخارگل و آویشن شیرازی EC50 بیشتر و selectivity کمتری در مقایسه با مورد و درمنه کوهی در کشت سلولی نشان دادند. فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها به طور معنی داری کمتر از پریمتامین بود.

نتیجه گیری:

به نظر می رسد که سرخارگل اثر مهارکنندگی قویتری در مقایسه با سایر عصاره ها دارد. بنابراین مطالعه بیشتر روی فعالیت ضد توکسوپلاسمایی فراکشن های این عصاره توصیه می شود.

کلید واژه::

توکسوپلازما گوندی، مورد، زردچوبه، درمنه کوهی، سرخارگل، آویشن شیرازی ، فلفل سیاه.

عنوان

صفحه

فصل اول: مقدمه	۱
اهمیت توکسوپلازما و توکسوپلاسموز	۲
تاریخچه توکسوپلازما گوندی ای	۳
تاکسونومی توکسوپلازما گوندی ای	۴
پیشرفتهای عمده در تحقیقات توکسوپلازما گوندی ای	۶
مورفولوژی و بیولوژی اشکال عفونی زای توکسوپلازما گوندی ای	۹
سیر تکاملی توکسوپلازما گوندی ای	۱۳
راههای انتقال توکسوپلازما گوندی ای	۱۶
انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلازما گوندی ای در نقاط مختلف کره زمین	۱۸
انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلازما گوندی ای در نقاط مختلف ایران	۱۸
بیماریزایی و علائم بالینی توکسوپلاسموز	۱۹
تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز	۲۰
درمان توکسوپلاسموز	۲۴
کنترل و پیشگیری توکسوپلاسموز	۲۶

۲۶	مروری بر تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی
۲۷	مروری بر انواع گیاهان دارویی مورد استفاده برای درمان عفونت ها در طب سنتی
۲۹	مروری بر وضعیت فعلی تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی و تجاری سازی فراورده های گیاهی
۲۹	مروری بر گیاهان مورد مطالعه، خواص درمانی و ترکیبات تشکیل دهنده آنها
۳۰	گیاه مورد
۳۳	گیاه درمنه کوهی
۳۵	گیاه زردچوبه
۳۷	گیاه سرخارگل
۳۸	گیاه فلفل سیاه
۴۰	گیاه آویشن شیرازی
۴۲	مروری بر تست MTT، اساس تست و کاربرد آن

فصل دوم: بیان مسئله، مرور متون، اهداف و فرضیات ۴۴

۴۵	بیان مسئله
۴۶	مرور متون
۴۶	اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی عصاره ها و فراکشن های گیاهی
۴۸	اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها و فراکشن های گیاهی
۵۳	اهداف و فرضیات
۵۳	اهداف اصلی

اهداف فرعی ۵۳

اهداف کاربردی ۵۴

فرضیه ها (Hypothesis) یا سوال ۵۴

فصل سوم: مواد و روش ها ۵۵

تهیه گیاهان مورد مطالعه و شناسایی آنها ۵۶

عصاره گیری ۵۶

تهیه و نگهداری سویه توکسوپلازما گوندی ای ۵۶

ارزیابی اثرات ضد توکسوپلازمایی عصاره های گیاهی ۵۶

اثرات ضد توکسوپلازمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول ۵۷

تهیه و آماده سازی عصاره های گیاهی ۵۷

تهیه بافر فسفات سالین (PBS) ۵۷

تهیه غلظت های مختلف از عصاره ها ۵۸

تکثیر و آماده سازی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای ۵۸

تهیه و آماده سازی رنگ متلین بلو قلیایی ۵۹

مجاورت عصاره های گیاهی با تاکی زوئیت ها و تعیین درصد مورتالیتی ۶۰

زیست سنجی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها در موش ۶۱

اثرات ضد توکسوپلازمایی عصاره های گیاهی در کشت سلولی ۶۱

دودمان سلولی مورد استفاده، تهیه، تکثیر و نگهداری آن ۶۱

۶۲	محلول های مورد نیاز.....
۶۲	تهیه و آماده سازی محلول رنگ آمیزی تریپان بلو.....
۶۳	تهیه محیط مغذی برای کشت سلول
۶۳	شمارش سلول های هلا و تعیین ویابلیتی سلول ها
۶۴	فرمول شمارش سلول های Hela.....
۶۴	فرمول محاسبه Viability.....
۶۴	آماده سازی تاکی زوئیت ها
۶۵	آماده سازی عصاره ها برای مجاورت با تاکی زوئیت ها در کشت سلولی
۶۵	تهیه و آماده سازی داروی پریمتامین
۶۶	مجاورت عصاره های گیاهی و داروی پریمتامین با تاکی زوئیت ها
۶۷	چارت مجاورت تاکی زوئیت ها با غلظت های مختلف عصاره ها و دارو در کشت سلول
۶۸	سنجش اثر سایتوتوکسیسیتی با روش MTT

فصل چهارم: نتایج ۷۰

۷۱	اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول
۷۱	میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره مورد
۷۳	میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره درمنه کوهی
۷۵	میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره فلفل سیاه
۷۷	میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره آویشن شیرازی

- میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره سرخارگل ۷۹
- میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره زردچوبه ۸۱
- نتایج زیست سنجی در موش ۸۲
- اثر مهاری عصاره های گیاهی بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی ۸۳

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۸۸

- بحث ۸۹
- نتیجه گیری ۹۵
- پیشنهادهای ۹۶
- منابع ۹۸
- خلاصه انگلیسی ۱۰۹

فهرست جداول ۷۰

- جدول ۱. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه مورد ۷۱
- جدول ۲. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه درمنه کوهی ۷۳

جدول ۳. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت	
های مختلف عصاره اتانولی گیاه فلفل سیاه.....	۷۵
جدول ۴. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت	
های مختلف عصاره اتانولی گیاه آویشن شیرازی.....	۷۷
جدول ۵. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت	
های مختلف عصاره اتانولی گیاه سرخارگل.....	۷۸
جدول ۶. میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت	
های مختلف عصاره اتانولی گیاه زردچوبه.....	۸۱
جدول ۷. نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه چند گانه.....	۸۲
جدول ۸. اثرمهارى عصاره های اتانولی گیاهان مورد، درمنه کوهی، سرخارگل و آویشن شیرازی بر تاکی زوئیت	
های توکسوپلازما گوندی ای در کشت سلولی Hela.....	۸۳
فهرست اشکال	۷۰

شکل ۱. درصد مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره	
مورد در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.....	۷۲
شکل ۲. درصد مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره	
درمنه کوهی در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.....	۷۴
شکل ۳. درصد مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره	
فلفل در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.....	۷۶

- شکل ۴. درصد مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره آویشن شیرازی در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه ۷۸
- شکل ۵. درصد مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره سرخارگل در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه ۸۰
- شکل ۶. درصد مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر عصاره زردچوبه در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه ۸۲
- شکل ۷. مقایسه درصد ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره مورد و داروی پیریمتامین در سلول های آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل ۸۴
- شکل ۸. مقایسه درصد ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره درمنه کوهی و داروی پیریمتامین در سلول های آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل ۸۵
- شکل ۹. مقایسه درصد ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره آویشن شیرازی و داروی پیریمتامین در سلول های آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل ۸۶
- شکل ۱۰. مقایسه درصد ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره سرخارگل و داروی پیریمتامین در سلول های آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل ۸۷

PBS	Phosphate buffered saline
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide
OD	optical density
HFF	human foreskin fibroblast
DMSO	Dimethyl sulfoxide
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
PCR	Polymerase Chain Reaction
TD 50	Toxic dose
ID50	Inhibitory Dose
LD50	Lethal Dose
EC50	Effective Concentration
Pen strep	Penicillin streptomycin

فصل اول

مقدمه

اهمیت توکسوپلازما و توکسوپلاسموز

توکسوپلاسموز (Toxoplasmosis) از بیماری های مهم انگلی با انتشار گسترده جهانی است که عامل آن تک یاخته داخل سلولی اجباری توکسوپلازما گوندی ای (Toxoplasma gondii) است. این تک یاخته می تواند طیف وسیعی از میزبانان مهره دار خونگرم را برای تکامل و بقاء خود انتخاب کند ولی میزبان قطعی آن گربه سانان به ویژه گربه است. آلودگی های انسانی با خوردن گوشت خام یا نیم پز حاوی کیست های نسجی و یا خوردن آب و سبزیجات خام آلوده به اووسیست های دفع شده با مدفوع گربه اتفاق می افتد. فرم مادرزادی این عفونت متعاقب عفونت اولیه دوره بارداری و انتقال تاکی زوئیت ها از جفت روی می دهد. توکسوپلاسموز اکتسابی در افراد با کفایت عملکرد ایمنی عمدتاً به صورت لنفادنوپاتی خوش خیم و خود محدود شونده بروز می کند. ندرتاً در این افراد سبب تظاهرات مغزی، قلبی و چشمی می شود. در افراد با عملکرد ایمنی مختل شده (Immunocompromised) به ویژه در بیماران ایدزی توکسوپلاسموز سیر بالینی پیشرونده ای دارد و عمدتاً ضایعات مغزی ایجاد می کند و تهدید کننده حیات است. به طوری که توکسوپلازما مهمترین عامل ایجاد کننده ضایعات کانونی مغزی و آنسفالیت در این بیماران است و در صورت عدم درمان به موقع سبب مرگ می شود. از طرف دیگر، توکسوپلاسموز از عفونت های مهم مادرزادی است که طیف بالینی گسترده ای دارد و از تولد نوزاد بدون علائم تا نوزاد با عوارض شدید مغزی و چشمی و حتی سقط متفاوت است. عفونتهای مادرزادی ناشی از توکسوپلازما در صورت عدم درمان می تواند باعث کوریوریتینیت، هیدروسفالی، میکروسفالی و کلسیفیکاسیون داخل مغزی در جنین شود. توکسوپلاسموز شایعترین علت اثبات شده کوریوریتینیت در دنیا است (۱).

در سال های اخیر توکسوپلاسموز از جهت دیگری نیز مورد توجه قرار گرفته است که به ماهیت عفونت های مزمن و طولانی مدت آن در مغز مربوط می شود. در دهه های اخیر گزارشاتی است که بین عفونت های مزمن توکسوپلاسم و برخی اختلالات نرولوژیک و بیماری های روان پریشی مثل اسکیزوفرنیا ارتباط وجود دارد. همچنین انگل توکسوپلاسم گوندی ای به عنوان یک عامل سببی احتمالی اختلالات دو قطبی، اپی لپسی کریپتوژیک، میگرن، تغییرات شخصیتی و رفتاری مورد توجه محققین توکسوپلاسم قرار گرفته است. از طرف دیگر، توکسوپلاسم در دامپزشکی نیز از اهمیت خاصی برخوردار است و یک عامل مهم سقط در دام ها به ویژه گوسفند، بز و خوک شناخته شده است. چرخه زندگی این انگل در طبیعت شناخته شده، اما هنوز نکات ناشناخته ای در چرخه زندگی توکسوپلاسم وجود دارد. تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز نیز از پرچالش ترین موارد تشخیص آزمایشگاهی بیماری های انگلی است. به طوری که همواره بخش عمده ای از تحقیقات توکسوپلاسم را به خود اختصاص داده است. داروهای سنتتیک علیرغم کارآیی فوق العاده در درمان بسیاری از بیماری ها در برخی موارد با محدودیت هایی همراه هستند. داروهای سنتتیک ضد توکسوپلاسم دارای اثرات جانبی قابل توجهی است و بر برادی زوئیت های داخل کیست های بافتی بی تاثیرند. همچنین با توجه به محدودیت های داروهای صناعی در درمان توکسوپلاسموز محققان بدنبال دستیابی به دارویی با اثرات سمیت کمتر هستند و فراورده های گیاهی به عنوان یک ترکیب جایگزین احتمالی در تحقیقات توکسوپلاسموز مورد توجه می باشد.

تاریخچه توکسوپلاسم گوندی ای

تاریخچه بیماری در جهان

توکسوپلازما گوندی اولین بار در سال ۱۹۰۸ توسط نیکول و مانسئوکس (Nicolle and Manceaux) که در شمال آفریقا بر روی جونده ای به نام کتنو داکتیلوس گوندی (*Ctenodactylus gundi*) که برای مطالعات لیشمانیازیس استفاده می شد، شرح داده شد. این جونده با موش صحرایی قرابت دارد. اسپلندور (Splendore) نیز که در برزیل بر روی خرگوش ها کار می کرد این ارگانسیم را در سال ۱۹۰۸ توصیف نمود. انتشار این گزارشات در فاصله ۳ روز از یکدیگر صورت گرفت، بدون اینکه این محققین اطلاعی از یکدیگر داشته باشند. در سال ۱۹۲۳ ژانکو (Jancoue) چشم پزشک مقیم پراگ مقاطع کیست و تروفوزوئیت های این انگل را در برش بافتی نوزاد با توکسوپلاسموز مادرزادی گزارش کرد (۱). نام این تک یاخته اشاره به هلالی یا کمانی بودن تک یاخته (در زبان یونانی *Toxon* به معنای کمان می باشد) است. به دنبال این کشف سالهای بعد از آن ارگانسیم هایی شبیه توکسوپلازما گوندی ای در چندین میزبان دیگر شناسایی گردید (۲). در سال ۱۹۴۸ آزمون سرولوژیک دای تست (*Dye test*) توسط سایین و فلدمن جهت تشخیص بیماری ارائه شد و این روش موجب شد تا محققان بسیاری از مسائل اپیدمیولوژیکی و بالینی توکسوپلاسموز را مورد بررسی قرار دهند و طیف بیماری را در انسان مشخص نمایند (۱). در سال ۱۹۶۰ چندین بررسی نشان دادند که چرخه جنسی انگل توکسوپلازما در گربه انجام می شود و میلیون ها اووسیست با مدفوع گربه دفع می شود. این اووسیست ها برای میزبان های واسط انگل شامل انواع حیوانات خونگرم (پرندگان و پستانداران) عفونی زا است (۲).

تاکسونومی توکسوپلازما گوندی ای

طبقه بندی توکسوپلازما گوندی ای بر اساس کتاب Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' *foundations of parasitology* به شرح زیر است (۴):

Classification of *T. gondii*

Serup-group	Chromalveolata
Superphylum	Alveolata
Phylum	Apicomplexa
Class	Conoidasida
Subclass	Coccidiasina
Order	Eucoccidiorida
Suborder	Eimeriorina
Family	Sarcocystidae
Subfamily	Toxoplasmatinae
Genus	Toxoplasma
Species	<i>gondii</i>

پیشرفت های عمده در تحقیقات توکسوپلازما:

تحقیقات گسترده ای در زمینه های مختلف توکسوپلازما به ویژه در سه دهه اخیر انجام شده است که مهمترین آنها توسط Boothroyd در سال ۲۰۰۹ گردآوری شده است که شامل ۲۵ پیشرفت عمده در ۲۵ سال اخیر می باشد. مطالب زیر برگرفته شده از این مقاله می باشد (۳):

۱. شناسایی ژنوتایپ های توکسوپلازما: با استفاده از روش مولکولی مشخص شد که توکسوپلازما دارای ۳ ژنوتایپ (کلون) اصلی I, II, III می باشد و در سویه های جدا شده از انسان و حیوانات خانگی / مزرعه تفاوت بسیار کمی مشاهده شده است.

۲. تفاوت آنتی ژنی و بیوشیمیایی مراحل مختلف تکاملی توکسوپلازما (تاکی زوئیت ها و برادی زوئیت ها).

۳. تبدیل تاکی زوئیت ها به برادی زوئیت ها تحت شرایط استرس در *Invitro*

۴. دستکاری ژنوم توکسوپلازما در شرایط *Invitro*

۵. شناسایی ژنوم توکسوپلازما: شامل ۱۴ کروموزوم و 65-70 Mbp.

۶. آمیزش های آزمایشگاهی برای ترسیم فنوتایپ ها و ژنهای مهم.

۷. شناسایی Apicoplast به عنوان یک پلاستید.

۸. شناسایی نقش میکرونم ها از نظر ترشح مواد چسبنده مهمی که در حرکت سر خوردن و تهاجم سلولی نقش دارند.

۹. مشارکت پروتئین های راپتری و میکرونم در اتصال سلولی در طی تهاجم.

۱۰. شناسایی آنتی ژن های اختصاصی مرحله ای: آنتی ژن های متصل به Glycophosphatidylinositol (GPI) در مراحل مختلف تکاملی.

۱۱. آزاد شدن پروتئین هایی از دنس گرانول ها و راپتری ها از طریق غشا به داخل سلول.

۱۲. ورود پروتئین های محلول به طور مستقیم به داخل سلول.

۱۳. پلی مرفیسم پروتئین های مترشحه از راپتری.

۱۴. شناسایی برخی مسیر های بیوشیایی در توکسوپلازما که بسیار شبیه گیاهان بوده و در حیوانات وجود ندارد.

۱۵. شناسایی مسیرهای چندگانه برای تحریک ذاتی پاسخ ایمنی.

۱۶. شناسایی القا IL-12 و تولید INF گاما به عنوان مدیاتور اصلی در پاسخ ایمنی علیه توکسوپلازما.

۱۷. تعداد کمی از آنتی ژن های توکسوپلازما هدف پاسخ ایمنی قرار می گیرند.

۱۸. نقش MHC به عنوان یک شاخص و متغیر مهم در بروز توکسوپلاسموز

۱۹. شناسایی اختلال مسیر اپوپتیک در سلول های آلوده به انگل .

۲۰. تمایز آنسفالیت توکسوپلاسمایی در بیماران ایدزی از سایر بیماری ها با استفاده از تکنیک های تصویربرداری غیرتهاجمی.

۲۱. PCR به عنوان یک روش حساس در تشخیص توکسوپلازما.

۲۲. پیشرفت هایی در تمایز سرولوژیک عفونت های حاد از مزمن.

۲۳. شناسایی عملکرد ارگانل به عنوان منبع مهم اهداف داروهای جدید.

۲۴. استفاده از انگل تضعیف شده به عنوان یک کاندید مناسب برای تولید واکسن

۲۵. توکسوپلازما و تاثیر آن بر رفتار میزبان.

مورفولوژی و بیولوژی اشکال عفونی زای توکسوپلازما

اشکال مختلف این تک یاخته شامل موارد زیر است:

الف) اشکالی که در سلولهای بافتهای خارج روده ای میزبان واسط و نهایی دیده می شوند شامل:

۱. تاکی زوئیت (Tachyzoite)

۲. کیست کاذب (Pseudocyst)

۳. کیست نسجی (Tissue Cyst)

ب) اشکالی که در اپیتلیوم روده و مدفوع میزبان نهایی دیده می شوند:

۱. تروفوزوئیت (Trophozoite)

۲. گامتوسیت (Gametocyte)

۳. زیگوت (Zygote)

۴. اووسیست (Oocyst) (۵).

۱. **تاکی زوئیت (Tachyzoite):** اجسام هلالی یا بیضوی با یک انتهای باریک و یک انتهای گرد

هستند. طول آنها ۵ تا ۷ میکرون و عرض آنها ۲ تا ۳ میکرون است. این شکل ارگانیزم با رنگ گیسما به

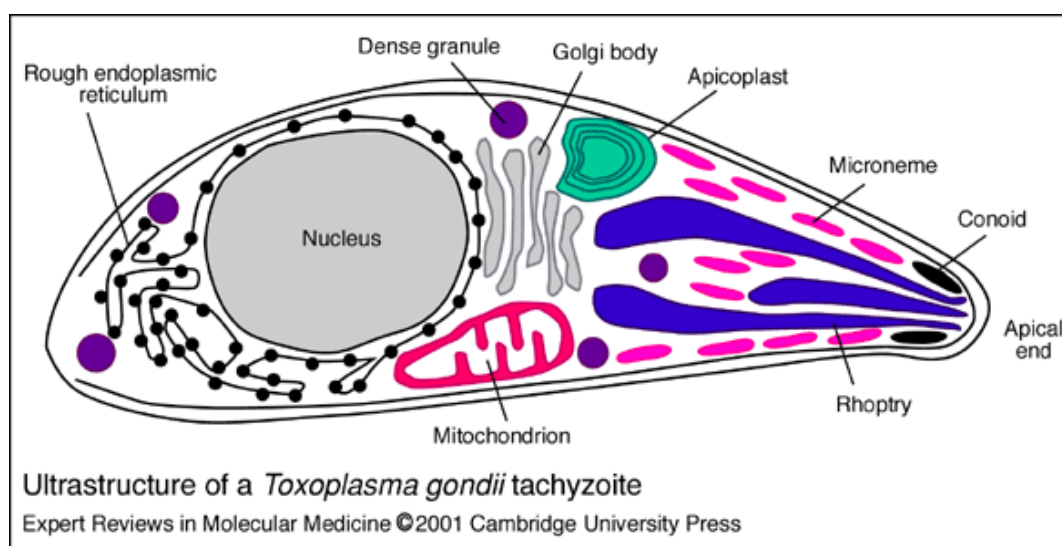
خوبی رنگ می گیرد. حرکت ارگانیزم با تا شدن بدن و یا لغزیدن توأم با چرخش در حول محور طولی بدن

صورت می گیرد. این فرم ارگانیزم را می توان در صفاق موش، سلول های نسج پستانداران یا تخم مرغ تکثیر

داد (۱). هسته تقریباً در مرکز سلول واقع شده و تاژک، مژه یا پای کاذب ندارد. تاکی زوئیت توکسوپلازما

دارای دستگاه گلژی، ریبوزوم، رتیلولوم آندوپلاسمیک و میتوکندری است. جهت انجام آزمون های

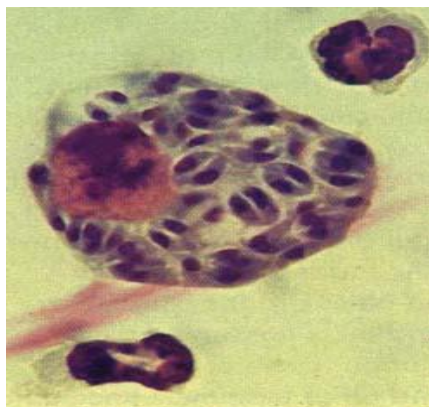
سرولوژیک (سایین- فلدمن و فلورسنت آنتی بادی) از این فرم انگل به عنوان آنتی ژن استفاده می شود. علت آنکه توکسوپلازما باید یک ارگانیسم داخل سلولی اجباری باشد روشن نیست، اما به طور قطع نیاز به انرژی ، عامل آن نمی باشد زیرا آنزیم های میتوکندریال به صورت کامل در ارگانیسم وجود دارد. تکثیر در نسوج با روش آندودیوژنی انجام می شود و تکرار این عمل موجب تشکیل کیست می گردد. آندودیوژنی یک مرحله از جوانه زدن داخلی است که در آن دو سلول دختر از سلول های مادر تشکیل می شود. شکل تاکی زوئیت انگل در مرحله ی حاد عفونت دیده می شود و می تواند تمام سلول های نسوج پستانداران را مورد حمله قرار دهد. پس از حمله، انگل هر ۴ تا ۶ ساعت یک بار تکثیر می یابد و روزت تشکیل می دهد. سیتوپلاسم انباشته از تاکی زوئیت ها پاره می شود و ارگانیسم های آزاد شده به سلول های مجاور حمله می کند(۵).



تاکی زوئیت توکسوپلازما گوندی ای

۲. کیست کاذب: تاکی زوئیت ها در داخل سلول های هسته دار میزبان واسط مانند ماکروفاژ یا منوسیت ها تکثیر یافته و به این عناصر شبه کیستی (حاوی تروفوزوئیت حاصل از عمل آندودیوژنی) اصطلاحاً کیست

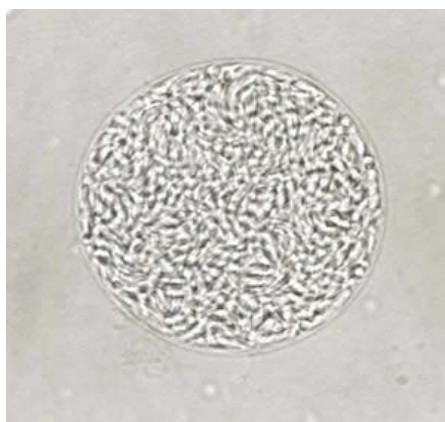
کاذب و در این حالت به انگل های درون آن اندوزوئیت گفته می شود. اجزای داخلی کیست کاذب از نظر رنگ آمیزی PAS (Periodic Acid Schiff) منفی هستند. در این شکل از انگل ۲۰ تا ۴۰ تاکی زوئیت درون یک سلول دیده می شود. این کیست ها ممکن است درون سلول میزبان برای مدت های طولانی بدون تشکیل کیست حقیقی باقی بمانند . کیست کاذب در مراحل حاد بیماری تشکیل شده و به طور دائمی تشکیل نمی گردد، بلکه تشکیل آن به صورت موقت یا موضعی است (۵).



Pseudocyst of *Toxoplasma gondii* in polymorphonuclear

۳. کیست نسجی: شکل دیگر انگل ، کیست نسجی است که درون سلول میزبان تشکیل می شود و اندازه آن از کیست کوچک (دارای چند ارگانیسم) تا کیست بزرگ حاوی بیش از سه هزار ارگانیسم متغیر است. این شکل انگل به خوبی با روش پاس (PAS) رنگ می گیرد و لذا از زمینه ی نسجی تشخیص داده می شود. کیست ها اغلب در طی ۸ روز از آغاز عفونت در حیوانات تشکیل می شود و احتمالاً برای تمام عمر میزبان در بدن او به حیات خود ادامه خواهند داد. هرچند که کیست ها در هر عضوی از بدن یافت می شوند اما مغز ، قلب و عضلات شایع ترین محل های عفونت نهفته هستند. سرما و به دنبال آن گرم کردن، حرارت بیش از ۶۶ درجه سانتی گراد یا مواد ضد عفونی قادرند شکل کیستی انگل را نابود کنند. ارگانیسم ها می توانند برای مدت دو ماه

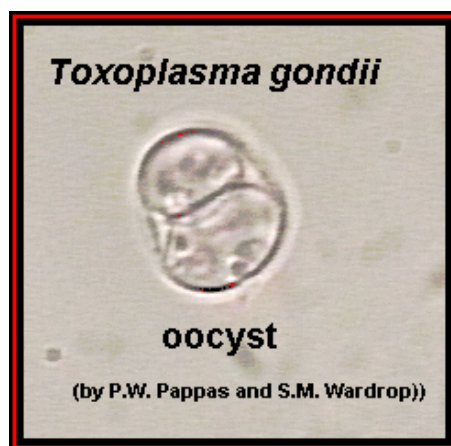
در دمای ۴ درجه سانتی گراد زنده بمانند، اما در حرارت ۹ تا ۲۰ درجه زیر صفر در مدت ۳ تا ۴ ساعت از بین می روند. براساس اطلاعات موجود به نظر می رسد که انجماد گوشت در بیست درجه زیر صفر برای مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت و سپس ذوب کردن آن روش مناسبی جهت نابودی کیست هاست (۱).



Tissue cyst of *Toxoplasma gondii*

۴. اواوسیست (Oocyst): چرخه انتروپیتلیال در روده اعضای خانواده گربه سانان انجام می شود و به تشکیل اوسیست منجر می گردد. شیزوگونی و گامتوگونی به نظر می رسد که در تمام روده باریک و بخصوص در رأس پرزها در ایلئوم صورت گیرد. در گربه ها فاصله زمانی از خوردن کیست ها تا تشکیل اوسیست بین ۳ تا ۱۰ روز و تا دفع اوسیست ها از مدفوع ۲۰ تا ۴۰ روز است. بعد از دفع اوسیست توسط مدفوع گربه، زایگوت به دو اسپوروبلاست تقسیم میشود و هر اسپوروبلاست با تقسیمات بعدی چهار اسپروزوئیت در درون هر اسپوروسیست و جمعاً ۸ عدد در یک اوسیست ایجاد می کند. یک اوسیست رسیده وقتی که خورده شود آلوده کننده است و منجر به تشکیل اشکال خارج روده ای انگل می شود. در داخل بدن گربه، این شکل انگل می تواند وارد چرخه انتروپای تلیال نیز گردد. اوسیست ابتدا کروی است و سپس بیضی شکل به ابعادی با طول ۱۱

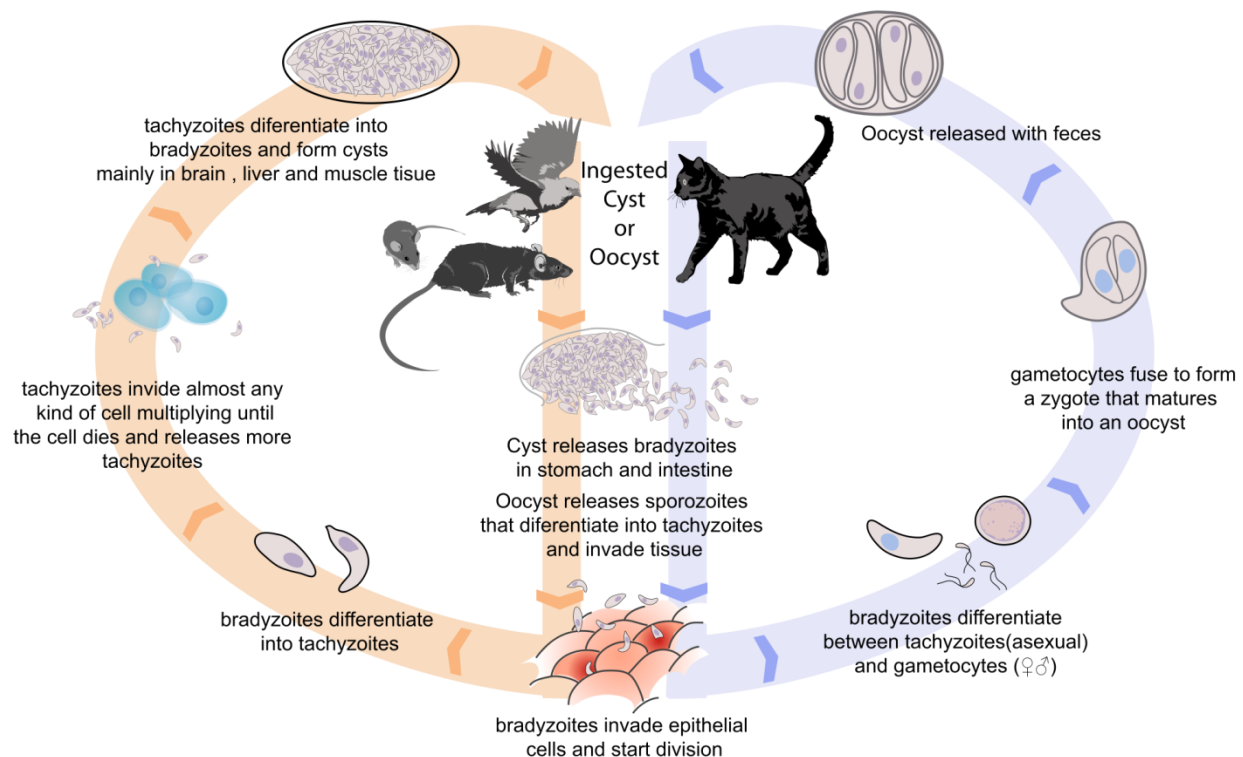
تا ۱۴ میکرون و عرض ۹ تا ۱۱ میکرون می گردد. براساس درجه حرارت و فراهم بودن اکسیژن، اسپورولاسیون در فاصله یک تا ۲۱ روز صورت خواهد گرفت. این عمل در حرارت کمتر از ۴ درجه یا بیش از ۳۷ درجه سانتی گراد انجام نمی شود. اوسیست ها برای مدت ۷ تا ۲۰ روز از طریق مدفوع دفع می گردد و ممکن است تعداد آنها در یک روز متجاوز از ده میلیون باشد. در حرارت و رطوبت مناسب اوسیست ها در مدت یک تا ۵ روز برای سایر جانوران از جمله انسان آلوده کننده می گردند. به علاوه در شرایط مساعد می توانند برای یکسال یا بیشتر در خاک زنده بمانند (۱ و ۵).



Oocyst of Toxoplasma gondii

سیر تکاملی توکسوپلازما گوندی ای

انگل توکسوپلازما گوندی ای می تواند طیف وسیعی از میزبانان مهره دار خونگرم را برای تکامل و بقاء خود انتخاب کند ولی میزبان قطعی آن گربه سانان به ویژه گربه است. آلودگی های انسانی با خوردن گوشت خام یا نیم پز حاوی کیست های نسجی و یا خوردن آب و سبزیجات خام آلوده به اووسیست های دفع شده با مدفوع گربه اتفاق می افتد، در سیر تکاملی این انگل دو مرحله روده ای و خارج روده ای وجود دارد (۱):



Life cycle of *Toxoplasma gondii*

۱. مرحله جنسی یا روده ای یا انتروپیتلیال (Entero epithelial): میزبان اصلی این

انگل گربه و گربه سانان است و سیکل انتروپیتلیال فقط در روده باریک این جانوران انجام می گیرد. گربه ممکن است از طرق مختلفی آلوده شود ولی راه عمده آن خوردن گوشت حاوی کیست نسجی است. در دستگاه گوارش گربه کیست نسجی پاره شده، برادی زوئیت ها (Bradyzoites) آزاد گشته و به تاکی زوئیت تبدیل می شوند. تاکی زوئیت ها وارد سلول های اپی تلیال روده گربه شده و گرد می شوند و شروع به تکثیر از نوع غیر جنسی یا شیزوگونی (Schizogony) می کنند، لذا در اینجا به آن تروفوزوئیت می گویند. تروفوزوئیت ها مراحل شیزوگونی را طی می کنند یعنی به ترتیب ایجاد شیزونت نارس، شیزونت رسیده و

مروزوئیت (merozoites) می کنند که سلول پوششی روده را پاره کرده و از آن خارج می شوند. در هر شیزونت رسیده توکسوپلازما ۱۶-۲۴ مزوزوئیت به وجود می آید. معمولاً شیزوگونی در روده گربه دو تا سه بار انجام شده و مزوزوئیت های نسل آخر وارد مرحله گامتوگونی می شوند. بعد از ورود به سلول های اپی تلیال، برخی به گامتوسیت نر (میکروگامتوسیت) و برخی به گامتوسیت ماده (ماکروگامتوسیت) تبدیل می شوند. ماکروگامتوسیت (Macrogametocyte) با کاهش کروموزومی به ماکروگامت و میکروگامتوسیت (Microgametocyte) با کاهش کروموزومی و عمل اکسفلایژیشن (exflagylation) به میکروگامت تاژکدار تبدیل می شوند. میکروگامت ها به سوی ماکروگامت ها کشیده شده و بعد با هم ادغام شده (Syngamy) و تشکیل تخم (Zygote) می دهند. سپس اطراف زیگوت دیواره ای تشکیل می شود و تبدیل به اووسیست نارس می شود. اووسیست های نارس سلولهای اپی تلیال را پاره کرده و با مدفوع گربه در محیط خارج پخش می شوند. در محیط خارج طی ۱ تا ۵ روز تکثیر اسپرولاسیون صورت می گیرد و به اووسیست رسیده تبدیل می شوند که فرم آلوده کننده و عفونی انگل است (۵).

۲. مرحله غیرجنسی یا خارج روده ای یا نسجی یا فاز توکسوپلاسمیک (phase)

(Toxoplasmic): این مرحله در بدن انواع میزبان های واسط صورت می گیرد. انسان یا هر حیوان به دو شکل ممکن است به انگل آلوده گردند، یکی با خوردن گوشت حاوی کیست نسجی (حاوی برادی زوئیت ها) و دیگر با خوردن مواد غذایی آلوده به اووسیست انگل (که با مدفوع گربه در محیط خارج پخش شده است). در دستگاه گوارش انسان در نتیجه اثر اسید و آنزیم های گوارشی (پپسین، تریپسین و اسید کلریدریک) جدار خارجی اووسیست و کیست نسجی پاره شده و به ترتیب اسپروزوئیت ها و برادی زوئیت ها آزاد می

شوند که هر دو به تاکی زوئیت تبدیل می گردند. تاکی زوئیت ها در ناحیه سر خود دارای آنزیمی به نام PEF(Penetrating Enhancing Factor) هستند که به کمک آن می توانند سلول میزبان را سوراخ کرده و وارد سلول شوند، به این ترتیب انگل از جدار روده میزبان گذشته و خود را به خون، لنف و سایر نسوج میزبان می رسانند. تاکی زوئیت ها درون سلول های میزبان به طریقه اندودیورنی تقسیم شده و تا ۴۰ وگاهی ۱۰۰ انگل درون سلول ایجاد می شود. به این تاکی زوئیت ها ، اندوزوئیت و به این شکل کیست کاذب می گویند. این تاکی زوئیت ها سرانجام سلول را پاره کرده، خارج شده و سلول های جدیدی را مورد حمله قرار می دهند. این نوع تکثیر تاکی زوئیت ها در مراحل حاد بیماری اتفاق می افتد و معمولاً ۲ تا ۳ هفته دوام دارد و متعاقب پاسخ ایمنی میزبان پس از ورود به داخل سلول های میزبان تشکیل کیست نسجی می دهد. انگل داخل کیست به فرم برادی زوئیت به کندی تکثیر می کند. داخل کیست نسجی ممکن است چند تا چند صد عدد برادی زوئیت تکثیر یابد. کیست نسجی می تواند در هر بافتی تشکیل شود، ولی بیشتر در مغز، قلب و عضلات تشکیل می گردد. کیست نسجی دوام طولانی دارند و ممکن است تا آخر عمر در بدن میزبان خود باقی بماند(۱).

راههای انتقال توکسوپلازما گوندی

توکسوپلازما دارای دو راه اصلی انتقال اکتسابی و انتقال مادرزادی است.

۱. انتقال دهانی (اکتسابی): اصلی ترین راه انتقال توکسوپلاسموز، انتقال این بیماری از طریق دهان می باشد. خوردن اووسیست های رسیده (از خاک آلوده به مدفوع گربه) و برادی زوئیت ها (از گوشت نیمه خام)

می تواند باعث انتقال بیماری شود. اگرچه خوردن گوشت دارای کیست انگل یکی از راه های انتقال بیماری به گوشتخواران می باشد، آلوده شدن حیوانات گیاه خوار مستلزم خوردن اووسیست است (۱).

۲. انتقال از طریق جفت (مادرزادی): حدود یک سوم زنانی که در حین بارداری برای بار اول مبتلا به توکسوپلازما می شوند، عفونت را به جنین خود منتقل می کنند. ابتلا جنین به انگل در طی دوران بارداری متفاوت است به طوریکه ابتلا جنین به توکسوپلازما در زنان در طی سه ماهه ی اول حاملگی حدود ۱۰ تا ۱۵٪ است و در سه ماهه ی دوم بارداری حدود ۳۵٪ و در سه ماهه آخر بارداری احتمال انتقال توکسوپلازما از مادر به جنین بالغ بر ۶۰ درصد می سد. (۱).

راه های کم شایع انتقال:

۱. انتقال از طریق زخم: این نوع انتقال بیشتر در کارکنان کشتارگاهها و کشاورزان اتفاق می افتد.
۲. انتقال از راه پیوند عضو: پیوند عضو از دهنده آلوده به گیرنده غیر ایمن می تواند سبب انتقال توکسوپلازما شود که معمولاً به این طریق کیست های نسجی دخالت دارند (۶).
۳. انتقال از طریق شیر خام و از تخم مرغ و اشک و بزاق: این انگل می تواند ۴ تا ۷ روز در بزاق، اشک، ادرار و شیر زنده بماند (۶).
۴. انتقال از راه بندپایان: بندپایان در انتقال مکانیکی انگل می توانند نقش داشته باشند. نقش انواعی از مگس ها، سوسک ها و کنه های ایکسودیته در انتقال این انگل مشخص شده است (۷).

انتشار جغرافیایی توکسوپلازما گوندی ای:

عفونت توکسوپلازما گوندی ای طیف گسترده ای در سراسر نقاط کره زمین از مناطق گرمسیری تا مناطق سردسیری را در بر می گیرد. این عفونت انتشار وسیعی در انسانها و حیوانات خونگرم دارد. میزان شیوع عفونت در انسان با توجه به مکان زندگی، عادات غذایی، وفور گربه و سن افراد متفاوت است. مطالعات سرواپیدمیولوژیکی که در نقاط مختلف کره زمین انجام گرفته است، نشان می دهد که هنوز توکسوپلازما انگل بسیار شایعی در ساکنین کره زمین است. به طوری که در یک بررسی آنتی بادی توکسوپلازما گوندی ای با الایزا در فیلیپین در منطقه ای روستایی ۶۱٪ و در منطقه شهری ۱۱٪ افراد مثبت بودند (۸)، از ۱۵۰۰ بچه مورد مطالعه در چین که میانگین سن آنها ۹ سال بود، کل شیوع عفونت در این جمعیت ۱۳/۱۵٪ است که از این تعداد ۱۳/۱۳٪ IgG مثبت، ۳/۱۳ هم IgG, IgM مثبت و ۲٪ IgM مثبت و IgG منفی بودند (۹). همینطور ۱۲/۳٪ از ۲۶۳۴ فرد سالم و ۵۴۷ بیمار روان پریش در چین (۱۰)، ۸۳/۵٪ از ۳۸۲ دانش آموزان ابتدائی در جنوب نیجریه (۱۱)، ۶۸/۴٪ از ۲۶۳ زن باردار مراجعه کننده برای مراقبت های پیش از زایمان در اتیوپی (۱۲)، ۴۷٪ در منطقه ای روستایی در فرانسه (۱۳)، ۱۷/۳٪ از ۴۴۵ بیمار روانی در شرق چین (۱۴)، ۸۵٪ از ۳۹۰ کشاورز و ماهیگیر در غنا (۱۵)، ۳۵/۴٪ از ۴۸ زن با سقط جنین در هند (۱۶) از نظر آنتی بادی ضد توکسوپلازما مثبت بودند.

انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلازما گوندی ای در ایران:

مطالعات مختلفی که در نقاط مختلف جغرافیایی ایران انجام شده است، دلالت بر این دارد که توکسوپلازما انگل شایعی در انسان و حیوانات در کشور ماست. به طوری که، ۱۹/۳٪ از ۱۱۴۸۰ اهدا کننده خون در جنوب

ایران (۱۷)، ۲۸/۸٪ از ۵۰۰ نفر اهداکننده خون در کرمان (۱۸)، ۳۰٪ از ۵۰۱ زن باردار با میانگین سنی ۲۷ سال در خوزستان (۱۹)، ۳۴٪ از بین ۴۰۰ نفر زن مراجعه کننده به مرکز بهداشت در قزوین برای آزمایشات قبل از ازدواج (۲۰)، ۲۴/۶٪ از ۱۳۰ زن با سقط جنین و ۲۱/۵٪ از ۱۳۰ زن با زایمان طبیعی در اهواز (۲۱)، ۱۲/۴٪ از ۴۰۲ دختران دبیرستانی شهری ۲۵/۹٪ از ۱۴۷ دختر دبیرستانی روستایی در عجبشیر در آذربایجان (۲۲)، ۳۵/۱٪ از ۱۷۱ نمونه سرمی مراجعه کنندگان به آزمایشگاه تشخیصی در بیمارستان علی نسب تبریز (۲۳)، ۴۴/۸٪ از ۵۵۳ زن باردار در استان ایلام (۲۴)، ۲۶/۱٪ از زنان شهری و ۳۲/۳٪ از زنان روستایی مراجعه کننده به بیمارستان شهید بهشتی همدان (۲۵) از نظر آنتی بادی ضد توکسو پلاسما مثبت بودند. همچنین در یک مطالعه مروری میزان شیوع توکسوپلاسما در کل کشور حدود ۳۹/۳٪ افراد برآورد شده است (۲۶).

بیماری‌زایی و علائم بالینی توکسوپلاسموز

به طور کلی توکسوپلاسموز به دو صورت اکتسابی و مادرزادی مطرح می باشد:

۱. توکسوپلاسموز اکتسابی (Acquired):

عفونت توکسوپلاسموز در ۷۰-۸۰ درصد موارد ساب کلینیکال است و علائمی ندارد ولی در ۲۰-۳۰ درصد موارد دارای علامت است. در شکل خفیف بیماری علائمی مانند بیماری منونوکلئوز عفونی (برای مثال لنفادنیت و لنفادنوپاتی در ناحیه گردن) دیده می شود. در شکل حاد بیماری، تب و لرز، بزرگی طحال و کبد و دردهای عضلانی شدید وجود دارد. ضایعات چشمی از موارد کم شایع توکسوپلاسموز اکتسابی است که معمولاً از

شبکیه شروع شده و به مشیمیه نیز می رسد (chorioretinitis) و ممکن است حتی منجر به کوری شود. شایعترین علامت در افراد با ایمنی طبیعی، بزرگی گره های لنفاوی گردنی می باشد. در افراد با عملکرد ایمنی مختل شده (Immunocompromised) به ویژه در بیماران ایدزی توکسوپلاسموز سیر بالینی پیشرونده ای دارد و عمدتاً ضایعات مغزی ایجاد می کند و تهدید کننده حیات است. به طوری که توکسوپلاسمای مهمترین عامل ایجاد کننده ضایعات کانونی مغزی و آنسفالیت در این بیماران است و در صورت عدم درمان به موقع سبب مرگ می شود (۱).

۲. توکسوپلاسموز مادرزادی (Congenital):

توکسوپلاسموز از عفونت های مهم مادرزادی است که طیف بالینی گسترده ای دارد و از تولد نوزاد بدون علائم تا نوزاد با عوارض شدید مغزی و چشمی و حتی سقط متفاوت است. توکسوپلاسموز مادرزادی زمانی اتفاق می افتد که مادر در دوره بارداری و یا در شرف بارداری سرونگاتیو (Seronegative) باشد و در زمان بارداری برای اولین بار به توکسوپلاسمای آلوده شده باشد. شانس ابتلاء جنین به بیماری با افزایش سن جنین افزایش می یابد اما شدت و وخامت بیماری با افزایش عمر جنین نسبت عکس دارد. عفونتهای مادرزادی ناشی از توکسوپلاسمای در صورت عدم درمان می تواند باعث کوریوریتینیت، هیدروسفالی، میکروسفالی و کلسیفیکاسیون داخل مغزی در جنین شود. بیشترین یافته بالینی در توکسوپلاسموز مادرزادی کوریوریتینیت است. (۱، ۲۷).

تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز

تشخیص توکسوپلاسموز بسیار مهم است چون علائم بالینی اختصاصی ندارد. چالش اصلی تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز، تمایز عفونتهای فعلی از قبلی است. روش های تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز عبارتند از:

۱. سرولوژی ۲. جداسازی انگل از خون و مایعات بدن ۳. روش ایمونوپراکسیداز ۴. روش پاتولوژی ۵.

روش ملکولی

آزمون های سرولوژیک در تشخیص توکسوپلاسموز: به طور کلی روش معمول تشخیص، سرولوژی است. انواع تست های سرولوژی برای تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز استفاده می شود که عبارت است از:

❑ آزمون رنگی سابین فیلدمن DT (Sabin-Feldman dye test)

❑ IFA (Indirect immunofluorescent antibody Assay)

❑ ISAGA (Immunosorbent Agglutination Assay)

❑ ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay)

❑ AC/HS test (Differential agglutination test)

❑ MAT (Modified Agglutination Test)

❑ IgG avidity Test

❑ Western Blot

تشخیص عفونت اولیه در خانم های حامله، تشخیص آلودگی در جنین و نوزاد، تشخیص توکسوپلاسموز چشمی و تشخیص توکسوپلاسموز در موارد اختلال ایمنی از اشکال مهم تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز هستند. به طور کلی روش معمول تشخیص، سرولوژی است. انواع آنتی بادی های IgG،

IgE، IgA، IgM بر ضد توکسوپلازما تولید می شوند، اما معمولاً برای تشخیص سرولوژیک توکسوپلاسموز ۲ آنتی بادی IgG و IgM همزمان مورد سنجش قرار می گیرد. به طور کلی، وجود IgG اختصاصی توکسوپلازما به تنهایی نشان دهنده عفونت مزمن و نهفته قبلی است. هر یک از انواع آنتی بادی های IgE، IgA، IgM می توانند شاخص عفونت اخیر باشند. اولین آنتی بادی که بر ضد توکسوپلازما تولید می شود IgM است که معمولاً در عرض کمتر از ۱ هفته از آلودگی قابل تشخیص است و بعد از ۲ هفته به حداکثر مقدار و بعد از ۳ تا ۴ ماه قابل تشخیص نیست. عمدتاً IgM ملاک شاخص عفونت حاد است. IgG با یک تاخیر چند روزه از IgM تولید می شود و بعد از حدود ۲ تا ۳ ماه به حداکثر رسیده و سپس به طور تدریجی کاهش می یابد و معمولاً سال های طولانی یا مادام العمر قابل تشخیص است. در تشخیص اولیه سرولوژیک توکسوپلاسموز این دو آنتی بادی به طور همزمان مورد سنجش قرار می گیرند. یکی از نقایص سنجش آنتی بادی های IgM و IgA ضد توکسوپلازما این است که در بعضی افراد ممکن است دوام طولانی داشته باشند و در مرحله مزمن هم قابل تشخیص باشد. به همین جهت تفکیک عفونت اخیر از قبلی را با مشکل مواجه می کند. در این موارد برای تشخیص دقیق تر از تست های تائیدی استفاده می شود که یکی از مهمترین تست های تائیدی IgG avidity است. اساس تست اویدیتی قوت اتصال آنتی بادی های IgG به آنتی ژنهای توکسوپلازما می باشد. آنتی بادی هایی که در اوایل عفونت تولید می شوند اتصال آنها به آنتی ژن قوی نیست و به واسطه اوره آنتی بادی ها از آنتی ژن ها جدا می شوند. معمولاً بعد از ۳ تا ۵ ماه آنتی بادی هایی که تولید می شوند به قوت به آنتی ژن چسبیده و اوره قادر نیست اینها را از آنتی ژن جدا کند. شاخص این تست Index avidity است که به صورت Low avidity، high avidity و borden line گزارش می شود. در عفونت های اخیر (کمتر از ۳ تا

۵ ماه) نتایج تست Low avidity است و بعد از آن به سمت high avidity می رود. مشکل این تست این است در برخی از افراد Low avidity هم دوام طولانی داشته و در مرحله مزمن ممکن است نتیجه همین باشد به همین جهت امروزه در مراکز معتبر مثل (Centers for Disease Control and Prevention) CDC پنلی از تستهای سرولوژی برای اشکال مختلف بالینی استفاده می شود. مهمترین کاربرد IgG avidity برای رد عفونت دوره بارداری در سه ماهه اول بارداری است. به عبارتی زنان بارداری که سه ماهه اول بارداری آزمایش شده و نتیجه آزمایش آنها High avidity است دلالت بر این دارد که عفونت آنها مربوط به پیش از بارداری است و خطری هم برای جنین وجود ندارد(۱).

جداسازی انگل از خون و مایعات بدن (روشهای پارازیتوتوزیک): جداسازی انگل از

خون و مایعات بدن نشانه قطعی عفونت حاد می باشد. برای این منظور می توان از روش کشت سلولی یا تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی (موش های سفید کوچک آزمایشگاهی) یا روش زیست سنجی در موش استفاده کرد. در روش زیست سنجی، نمونه خون یا سایر مایعات بدن به طریق داخل صفاقی، به چند موش تلقیح می شود و موش ها روزانه تحت نظر قرار می گیرند. اگر در دو سه هفته اول کم تحرک و کز کردند، انگل در اگزودای صفاقی آنها جستجو می شود ولی اگر حالت طبیعی داشتند، می توان بعد از یک ماه از شروع تلقیح، مغز موش ها را از نظر کیست های نسجی مورد آزمایش میکروسکوپی قرار داد. علاوه بر جداسازی انگل از خون و مایعات بدن، جداسازی انگل از بافتهای نوزادان نیز نشان دهنده عفونت اخیر یا حاد است. مشکل اصلی روش جداسازی این است که زمانبر است و انجام آن در هر کجا امکان پذیر نیست (۱).

روش مولکولی یا PCR (Polymerase Chain Reaction): از این روش برای

تشخیص توکسوپلازما در خون، مایعات بدن و بافتها استفاده می شود. تشخیص توکسوپلازما در خون و مایعات نشان دهنده عفونت اخیر توکسوپلازما است ولی نتایج مثبت PCR در نمونه های بافتی دلیل قطعی بر عفونت اخیر نیست. بیشترین کاربرد PCR در تشخیص توکسوپلاسموز در موارد عفونت های مادرزادی و تشخیص آلودگی در جنین است. برای این منظور مایع آمنیون به روش PCR مورد آزمایش قرار می گیرد. گفته شده که PCR انقلابی در تشخیص توکسوپلاسموز مادرزادی ایجاد کرده است (۱).

روش هیستوپاتولوژی: از بیوپسی غدد لنفاوی، مغز استخوان، طحال و... می توان گسترش تهیه نموده و

پس از رنگ آمیزی از نظر تاکی زوئیت یا کیست توکسوپلازما بررسی کرد. به طور معمول از این روش ممکن است برای تشخیص و تمایز توکسوپلاسموز از لنفوما استفاده شود. ظاهر پاتولوژیک غدد لنفاوی در الودگی به توکسوپلازما تا حدی اختصاصی است ولی همواره متمایز کننده نیست (۱).

روش ایمونوپراکسیداز: این روش، روش مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموز در نمونه بیوپسی در

بیماران ایدزی با آنسفالیت است که با این روش ناکی زوئیت ها قابل تشخیص می باشند (۱).

درمان توکسوپلاسموز

توکسوپلاسموز اکتسابی در افرادی که با کفایت ایمنی هستند بدون علائم بالینی است و بدون درمان هم علائم بیماری فروکش می کند ولی انگل به صورت مزمن در بدن باقی می ماند، اما در سایر موارد توکسوپلاسموز نیاز به درمان دارویی دارد. با علم به اینکه دارو در شکل کیستی تاثیری بر انگل ندارد یا تاثیر ناچیزی دارد، موارد

مزمّن بیماری احتیاج به درمان ندارند. در موارد حاد با علائم بالینی از ترکیب پیریمتامین یا داراپریم (Pryimetarmin or Daraprim) و سولفادیازین (Sulfadiazin) استفاده می شود که پیریمتامین بر روی اشکال نسجی و سولفانامید بر روی اشکال خونی موثر است. پری متامین و سولفونامید در جلوگیری از سنتز اسیدهای نوکلئیک انگل نقش دارند. از آنجائیکه پیریمتامین اثر آنتاگونیستی بر روی فولات دارد بهتر است اسید فولینیک نیز همراه داروهای مذکور تجویز شود. با توجه به عوارض این دارو در طول حاملگی از داروی اسپیرامایسین استفاده می شود، خاصیت اصلی اسپیرامایسین اینست که انتقال از جفت را بالغ بر ۶۰٪ موارد کاهش می دهد (۱). سولفادیازین سبب بروز کریستالوری، هماچوری و واکنشهای ازدیاد حساسیت در افراد می شود. پیریمتامین باعث پوکی استخوان و اختلال در خون سازی می شود و در ضمن به علت ایجاد اثرات تراتوژنیک، تجویز این دارو در نیمه اول بارداری منع استعمال دارد. کلیندامایسین باکتریو استاتیک است و به ریپوزوم های تک یاخته متصل شده و سنتز پروتئین را مهار می کند. آزیترومایسین سنتز پروتئین در تک یاخته را مهار می کند، آزیترومایسین از ماکرولیدهای مشتق از اریترومایسین است که برای زنان باردار و بیماران جوان توکسیک است و نباید به مدت طولانی استفاده شود و اتوواکون اثر مهاری در زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری دارد و نهایتاً از سنتز DNA جلوگیری می کند. اتوواکون به دلیل داشتن عوارض جانبی مانند سردرد، بثورات جلدی، بالا رفتن سطح انزیمهای کبدی و محدودیت استفاده در زنان باردار به دلیل اثرات مضر دارو روی جنین به مدت طولانی قابل استفاده نیستند (۲۸). اسپیرامایسین به همراه پردنیزولون در بیماران توکسوپلاسموز چشمی کاربرد دارد. همچنین در زنان باردار با توجه به اینکه پیریمتامین اثر سوء دارد، این دارو قابل استفاده است که تا ۶۵٪ انتقال بیماری را کاهش می دهد. این دارو با دوز ۲-۴ گرم روزانه و به مدت ۳-۴ هفته مصرف می شود (۲۹).

کنترل و پیشگیری توکسوپلاسموز

مهمترین اقدامات پیشگیری کننده از توکسوپلاسموز عبارتند از:

۱. پختن و فریز کردن گوشت (غذاهای گوشتی حداقل در دمای حرارت ۶۰ درجه به طور کامل پخته شود.
گوشت را باید در سرمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز فریز یا منجمد کرد)
۲. انگل زدایی سبزیجات (سبزیها و میوهها باید به طور کامل شستشو و ضد عفونی شوند).
۳. پس از تماس دستها باگوشت خام و یا باغبانی در محل هایی که ممکن است آب آن محل آلوده به مدفوع گربهها باشد شستشوی دستها الزامی می باشد.
۴. رعایت اصول پیشگیری توکسوپلاسموز در دو گروه بسیار مهم است که عبارتند از: زنان حامله ای که از نظر سرولوژی توکسوپلاسمای منفی می باشند و افراد که دچار سندروم نقص ایمنی اکتسابی و مبتلا به بدخیمی های خونی هستند. همچنین افرادی که تحت درمان داروهای سایتوتوکسیک یا ایمونوساپرسیو می باشند.
۵. رعایت بهداشت در نگه داری گربه
۶. غربالگری زنان باردار
۷. جلوگیری از خاک بازی کودکان (۱).

تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی:

قدیمی ترین نسخه های داروهای گیاهی مربوط به ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح روی تکه سفالی سومری موجود است، کتابی به نام (Pen T'Sao) توسط امپراطوری در چین در ۲۵۰۰ قبل از میلاد مسیح نوشته شده است و حتی امروزه بعضی از داروهای گیاهی نامبرده در این کتاب استفاده می شود مانند ginseng و....، همچنین در کتاب ابرس پاپیروس (Ebers Papyrus) ۱۵۵۰ سال قبل از میلاد مسیح گروهی از داروهای گیاهی مانند سیر، سنا، آلوئه ورا و بسیاری از داروها نام برده شده است. به نظر می رسد مصریان و چینیان در زمره اولین جمعیت های بشری بوده اند که قبل از میلاد مسیح از گیاهان به عنوان دارو استفاده می کردند. در تاریخ باستان مهمترین نویسنده داروهای گیاهی دیوسکورید (Dioscorides) پدر علم گیاه شناسی که پزشک و داروشناس ارتش بود، دیوسکورید در حدود ۷۷ سال بعد از میلاد مسیح در حالی که سفرهای زیادی داشت بر روی گیاهان داروئی مطالعه می کرد. این دانشمند کتابی با اطلاعات ظاهری و مکان رشد و تاثیرات بیش از ۶۰۰ گونه گیاهی را تهیه نموده است که به دفعات زیادی این کتاب ترجمه شده است و در مطالعات علمی بسیار مورد استفاده قرار گرفته است. در قرون هشتم تا دهم میلادی دانشمندان ایرانی، ابوعلی سینا، محمد زکریای رازی و دیگران به دانش درمان با گیاه رونق زیادی دادند و کتابهای چون قانون و الحادی را به رشته تحریر درآوردند (۳۱ و ۳۰).

مروری بر انواع گیاهان دارویی مورد استفاده برای درمان عفونت ها در طب سنتی:

در طب سنتی ایران و دیگر کشورها از دیرباز از انواع گیاهان دارویی برای درمان انواع بیماری ها استفاده شده است. معمولاً گیاهان دارویی دارای مجموعه ای از اثرات بر روی انواعی از بیماری ها می باشند. در زیر به اثرات انواع گیاهان دارویی در طب سنتی اشاره می شود. به طوری که از ریشه، برگ و سر شاخه های هوایی

گیاه سرخارگل در درمان عفونت های قارچی، عوارض جانبی ناشی از اشعه درمانی، آرتريت روماتوئيد، مسموميت خونی، مسموميت های غذایی، درمان زخم های چرکی، آبسه، تبخال، التهاب بافت های پیوندی، زخم، سردرد اختلالات متابولیکی و همچنین در درمان حمایتی سرماخوردگی، عفونت های دستگاه تنفسی و ادراری به علت تحریک پاسخ ایمنی استفاده می شود. از ریزوم و ریشه ی خشک شده گیاه شیرین بیان در درمان گلو درد، سرفه، زخم های معده و اثنی عشر، سوء هاضمه، واکنش های آلرژیک، روماتیسم، آرتريت، صرع، بی اشتها، آپاندیسیت، کزاز، دیفتری استفاده می شود. از گل های ماده مخروطی شکل گیاه رازک در درمان بی خوابی بخصوص اشکال در بخواب رفتن، کرامپ های شکمی، کم خونی، عفونت باکتریایی، درماتیت، اسهال، لکوره، میگرن، ادم، مسکن، ضد کرم، ضد تب، ضد نفخ، کمک به هضم غذا استفاده می شود. از برگ ها و میوه گیاه زیتون در درمان عفونت های گوناگون باکتریایی، ویروسی و قارچی و همچنین تب بر، قابض، ضد عفونی کننده پوست، مفید در درمان مالاریا، کاهنده فشار خون، مفید در درمان دیابت نوع دوم می باشد. عصاره برگ درخت گردو خاصیت میکروب کشی و باکتری کشی، در درمان سردرد، سرماخوردگی و بیماری های پوستی بکار میرود. از روغن دانه های کرچک به عنوان مسهل، درمان مسمومیت های غذایی، ضد کرم، بر طرف کننده سوزش چشمی، درمان زگیل، درمان راش، جوش، کفگیرگ، آبسه استفاده می شود. از میوه رسیده و خشک شده نخل اری به عنوان مدر، درمان التهاب حنجره، بی اشتها، آلرژی، درمان سیاه زخم، سل، التهاب مثانه، گلودرد و ضد عفونی کننده مجاری ادراری استفاده می شود. دانه و اسانس رازیانه دارای خواص خلط آور، باد شکن، ضد میکروب، ضد التهاب و مدر میباشد (۳۲). برگ گیاه گزنه دارای خواص قابض، در گرفتگی عضلات، درمان اسهال و بواسیر کاربرد دارد. از سر شاخه های گیاه آویشن در درمان عفونت های انگلی، میکروبی، آسم، قابض، التهاب مزمن معده استفاده می شود. از دانه های خاکشیر در التیام زخمها، رفع

اسهال، تب بر و رفع کرم استفاده میشود. آنگوزه گیاهی است که دارای خواص ضد تشنج، کرم و رفع یبوست استفاده می شود (۳۱).

مروری بر وضعیت فعلی تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی و تجاری سازی فراورده های گیاهی:

داروهای سنتتیک علیرغم کارایی فوق العاده در درمان بسیاری از بیماری ها، دربرخی موارد با محدودیت هایی همراه هستند. به همین جهت امروزه پژوهش بر روی گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها به طور روزافزون رویکرد جهانی دارد و استفاده از گیاه درمانی و داروهای با منشا گیاهی در سالهای اخیر روبه فزونی است. گرایش به پژوهش بر روی گیاهان دارویی در جهان به طور قابل توجهی در دو سه دهه اخیر افزایش یافته است. تلاش هایی هم که در این زمینه در سال های اخیر در کشور های مختلف انجام شده است به تولید فراورده های دارویی منتهی شده است که امروزه فرم تجاری آنها قابل عرضه در داروخانه ها می باشد. از جمله این محصولات اسپری آلرگل از گیاه فلفل قرمز، پماد رزماری از گیاه اکلیل کوهی، پماد کالاندولا از گیاه همیشه بهار، شربت توسیان از گیاه آویشن، شربت باریج آلوئه ورا از گیاه صبر زرد، قطره ضد نفخ از گیاه نعنا، محلول بخور اکالپتوس از گیاه اکالپتوس، محلول خوراکی خلط آور زردبند از گل ختمی، قطره آفرودیت از گیاه زنجبیل، قطره استراگل از گیاه سیر (۳۳).

مروری بر گیاهان مورد مطالعه، خواص درمانی و ترکیبات تشکیل دهنده آنها

گیاه مورد (Myrtus communis): گیاه مورد متعلق به خانواده میرتاسه آ (Myrtaceae) که شامل

تقریباً ۱۴۵ نوع و بیش از ۵۵۰۰ گونه می باشد، مورد گیاهی گلدار است که حداکثر ۱۶ گونه از این گیاه در منطقه خاورمیانه و آسیا وجود دارد. مورد گیاهی درختچه ای، همیشه سبز و معطر با ساقه های بسیار متعدد و منشعب با ارتفاع ۱/۸ تا ۲/۴ متر است. این گیاه به میزان زیادی از شمال غربی تا شرق مدیترانه و غرب آسیا و همچنین در جنوب اروپا، شمال آفریقا و غرب آسیا وجود دارد (۳۴). این گیاه در ایران در لاب سفید دره بختیاری، دره رودخانه خراسان، سراب، گیلانغرب، کرمان، مهارلو در شیراز، نیریز، فسا، ممسنی و بندرعباس پراکندگی دارد (۳۵).

خواص درمانی گیاه مورد:

ترکیبات شیمیایی عصاره و روغن گیاه مورد: مهمترین متابولیت های ثانویه گیاه مورد پلی فنول ها و روغن ها هستند، گیاه مورد بسیار غنی در روغن های فرار، فنولیک اسید، فلاونوئیدها، تانن ها، رنگدانه های آنتوسیانین و اسیدهای چرب می باشد. در مطالعاتی که روی گیاه مورد انجام شده وجود چندین ترکیب شیمیایی دیگر را نشان می دهد، به عنوان مثال: برگهای خشک شده این گیاه شامل ۱/۸ - سینئول (1/8- cineole)، لینالول (linalool)، لینالیل استات (linalyl acetate)، ترپینئول (terpineole)، ترپینولن (terpinolene)، تانن ها (tannins) و ترکیبات فلاونوئید می باشد. ترکیبات برگ و گل این گیاه شامل روغن ها، فنولیک اسید، فلاونوئیدها و تاننها و همچنین دانه های گیاه حاوی تانن ها، آنتوسیانین و اسید های چرب می باشند.

ترکیبات اسانس روغنی گیاه مورد در بخشهای مختلف گیاه و فعالیت زیستی آنها:

ترکیبات اسانس روغنی گیاه مورد به سه دسته تقسیم می شود: ترپن ها، ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئید

به عنوان مثال در دسته ترپنها، لیمونن (Limonene) در گل گیاه مورد به عنوان ضد میکروب و گرماکرین (Germacrene-D) در عرق گیاه به عنوان ضد ویروس و در دسته ترپنوئیدها، لینالول (linalool)، میرتنول (Myrtenole) و ۱/۸-سینئول (1/8- cineole) به عنوان ضد باکتریال و در دسته فنیل پروپانوئیدها متیلئوگنول (Methyleugenol) در گل این گیاه به عنوان آنتی اکسیدان و ضد میکروب می باشد.

ترکیبات عصاره گیاه مورد به سه دسته تقسیم می شود: فنولیک اسیدها، تانن ها و فلاونوئیدها. در دسته فنولیک اسیدها، گالیک اسید و کافئیک اسید در برگ، عرق، گل و دانه گیاه به عنوان آنتی اکسیدان، آنتی موتازن، ضد تومور و ضد باکتریال و در دسته تانن ها دلفینیدین-۳-۰-گلوکوزید (Delphinidine-3-O-glucoside) در برگ، گل و دانه گیاه به عنوان آنتی اکسیدان و در دسته فلاونوئیدها، میریکتین (Myricetine) و کوئرکتین (Quercetine) در برگ، عرق و دانه گیاه به عنوان آنتی باکتریال، آنتی ویروس، آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد الرژی و ضد سرطان می باشد (۳۴).

در طب سنتی از اسانس این گیاه به عنوان ضد عفونی کننده استفاده می شد که علاوه بر اثر ضد عفونی کننده دارای خاصیت ضد باکتریال، ضد قارچ، ضد التهاب و ضد درد بوده و در کنترل بیماریهای از جمله دیابت قندی، بیماریهای ریوی و انواع سرطان بسیار موثر است. قسمت های مختلف گیاه مورد در طب سنتی کاربردهای مناسبی دارند. دم کرده ی برگ ها و شاخه های جوان گیاه به عنوان ضد عفونی کننده، قابض، کاهنده قند خون و همچنین برای درمان آسم، اگزما، پسوریازیس، اسهال، اختلالات گوارشی و عفونت های مجاری ادراری استفاده می شود (۳۴).

در زیر اشاره به کاربرد قسمت های مختلف گیاه می شود (۳۴):



Leaves of Myrtus communis

برگ: داروی خوراکی استفاده می شود به عنوان:
ضد عفونی کننده، ضد التهاب، ملین، تسکین دهنده
درد، عامل ضد انعقاد و مصرف موضعی برای بهبود
زخم



Seeds of Myrtus communis

دانه: مصرف خوراکی برای بیماریهای عفونی مانند
اسهال، اسهال خونی، و مصرف غیر خوراکی برای
بیماریهای پوستی و بهبود زخمها



Branches of Myrtus communis

شاخه: داروی آماده برای آسم، آگزما، پسوریازیس،
اسهال، اختلالات گوارشی و عفونت های مجاری
ادراری که به صورت موضعی بااستنشاقی استفاده
می شود.



Flowers of *Myrtus communis*

گلها: مصرف موضعی برای بهبود رگ های واریسی

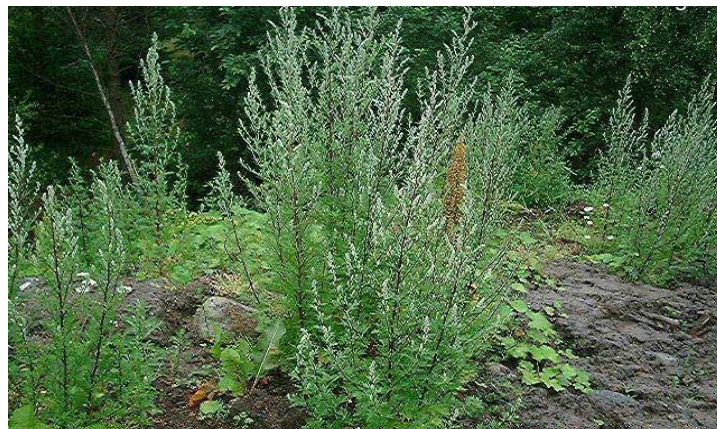
درمنه کوهی: گیاه درمنه کوهی با نام علمی (*Artemisia aucheri* Boiss) از خانواده کاسنی ها (compositae) است (۳۶). گیاهی پایا به ارتفاع ۲۵ تا ۵۰ سانتی متر بوده و اغلب گونه های این جنس طعم و عطر مشخصی دارند ناشی از ترکیبات مونوترپن و سزکویی ترپن های موجود در آنها است (۳۷). جنس آرتمیسیا حداکثر ۴۰۰ نوع است که به طور قابل توجهی در مناطق معتدله شمالی کره زمین انتشار دارد که از بین انواع این گیاه ۳۴ گونه در ایران وجود دارد (۳۶).

در طب سنتی درمنه کوهی به عنوان داروی قابض، ضد عفونی کننده، ضد لشمایا، ضد انگل و با فعالیت انتی اکسیدانی استفاده شده است که طبق مطالعات انجام شده ترکیبات اصلی این گیاه در روغن بدست آمده از اندام های هوایی بوده است.

ترکیلات اصلی موجود در روغن فرار دانه درمنه کوهی شامل: دکان (Decane)، پاراسیمن (Para-cymene)، ۱/۸-سینئول (1/8-cineol)، لینالول (Linalool)، بورنئول (Borneol) و... می باشد که این مواد موثره تاثیر قابل توجهی بر باکتری های اشرشیاکلی (*Escherichia coli*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و لیستریا مونوسیتوزنز (*listeria monocytogenes*) داشت. در

مطالعاتی که بر روی اندامهای هوای گیاه درمنه کوهی انجام شده است نشان می دهد که روغن های فرار به دست آمده از این قسمت ها اثرات ضد میکروبی بر ضد میکروارگانیسمهای از قبیل اشرشیا کلی و لشمانیا ماژور و بسیاری از باکتری ها داشته است. این محدودیت اثر ضد میکروبی روغن به دست آمده از دانه گیاه به خاطر تفاوت در ترکیبات موجود در دانه و اندام های هوایی گیاه است. (۳۶).

خواص درمانی: برای انواع درمنه علاوه بر فعالیت ضد کرمی ، فعالیت های بیولوژیک فراوانی از جمله میکروب کشی، ضد قارچی، ویروس کشی، ضد انگلی و همچنین دارای خواص ضد درد، اشتهاور، محرک، ضد عفونی کننده و همچنین خواص آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی به اثبات رسیده است (۳۶). مهمترین ترکیب در گونه های این جنس آرتمیزینین است که از آن به عنوان ضد مالاریا استفاده می شود (۳۸).



Artemisia aucheri boiss

زردچوبه: زردچوبه از خانواده زنجبیل با نام علمی (*Curcuma longa*) و با نام انگلیسی Turmeric

شناخته می شود. زردچوبه گیاهی است علفی و پایا به ارتفاع یک تا یک و نیم متر و دارای ریزوم متورمی است که از آن چندین ساقه هوایی خارج می شود. قسمت مورد استفاده غذایی و دارویی این گیاه ریزوم های خشک شده آن است. زردچوبه گیاه بومی نواحی گرم آسیا، نظیر کشورهای هندوستان، پاکستان، اندونزی، جنوب چین و بومی آفریقا و آمریکای جنوبی است و در ایران رویش ندارد (۳۹).

خواص درمانی: زردچوبه به عربی عروق الصفر، حشیشه الصفرا و به فارسی زردچوبه و به هندی هلدی نامیده می شود کورکومین (Curcumin) ماده موثره ریزوم گیاه زرد چوبه به نام شیمیایی difeouloylmethane با فرمول شیمیایی ($C_{12}H_{20}O_6$) است. علاوه بر کورکومین ترکیبات شیمیایی متعدد از جمله روغن فرار، زینجیرن، آلفا و بتا تورمرین و مواد دیگر از جمله آرابینوز، فروکتوز، گلوکز و نشاسته در ریزوم گیاه زرد چوبه وجود دارد. رنگ زردچوبه مربوط به مواد رنگی مثل کورکومین، دس متوکسی کورکومین (desmethoxycurcumin) و بیس دس متوکسی (bis-desmethoxycurcumin) است (۳۰). کورکومین فعالیت آنتی اکسیدان، آنتی ویروس، ضد التهاب و ضد قارچ دارد و همچنین مطالعات نشان می دهد که کورکومین اثرات سمی بر روی انسان ندارد. کورکومین اثرات ضد التهابی را با مهار تعدادی از مولکول هایی که در التهاب نقش دارند، نشان می دهد، همچنین زردچوبه کمک به پیشگیری از آرترواسکلوئوزیس با کاهش تشکیل کلامپ های خونی می کند. زردچوبه رشد هلیکوباکتر پیلوری را که باعث زخم معده و مرتبط با سرطان معده می باشد را کاهش می دهد. همچنین زردچوبه با اتصال به فلزات سنگین مانند کادمیم و سرب باعث کاهش اثرات سمی این فلزات در بدن شده و اثر محافظتی برای مغز دارد (۳۹).

اثرات ضد سرطانی زردچوبه از این نظر با اهمیت است که زردچوبه به عنوان یک ماده افزودنی به غذا مورد استفاده قرار می گیرد و مصرف این ماده با دوز بالا از تکثیر سلول های سرطانی پیشگیری ولی به سلول های سالم آسیبی وارد نمی کند. زردچوبه به طور مستقیم موجب مهار تشکیل عروق جدید و به طور غیر مستقیم با مهار تولید عوامل محرک در تشکیل عروق جدید، هورمون های رشد فیروبلاست و هورمون رشد اپیدرم، از رشد سلول های سرطانی پیشگیری می کند. پودر ریزوم این گیاه در فرآورده های دارویی جهت درمان بیماری های متعددی از جمله رماتیسم، بدن درد، انگل روده، اسهال، تب نوبه، اختلالات کبدی، ناخوشی معده، عفونت های مجاری ادرار، سوء هاضمه، التهابات، لکه های سفید در بدن، مشکلات قاعدگی، قولنج روده و بیماری های پوستی استفاده می شود (۳۹).



Curcuma longa

گیاه سرخارگل: سرخارگل گیاهی با نام علمی *Echinacea purpurea* و نام عمومی Echinaceae

است. این گیاه به خانواده Astaraceae یا Compositeae تعلق دارد و منشا آن شمال آمریکا گزارش شده است. با وجود اینکه این گیاه بومی ایران نیست اما در سال های اخیر وارد گیاهان بومی ایران شده است، این گیاه در کشورهای غربی به عنوان تقویت کننده سیستم ایمنی، ضد التهاب، آنتی ویرال و ضد سرطان مورد استفاده قرار می گیرد (۴۱ و ۴۲).

خواص درمانی: قسمت های مختلف گیاه از جمله ریشه و بخش های هوایی آن دارای خواص درمانی زیادی است برخی از این فواید عبارتند از تسریع در بهبود زخم ها ، نابودی باکتری ها و ویروس ها، درمان سرماخوردگی و مسمومیت های خونی، بیماری های برونشیتی و سینوزیت، درمان مارگزیدگی. عصاره سرخارگل از داروهای تقویت کننده سیستم دفاعی بدن می باشد تحقیقات جدید نشان دهنده این مطلب است که تأثیر سرخارگل در تقویت سیستم دفاعی بدن مربوط به ترکیبات پلی ساکاریدی گیاه مانند اکیناسن (Echinacein) و اکیناکوزید (Echinacoside) و ترکیبات آلکیل آمیدی آن می باشد. اکیناسه شامل مشتقات کافئیک اسید به ویژه شیکوریک اسید، کافتاریک اسید و کلروژنیک اسید و نیز آلکامیدها به ویژه ایزومرهای دو دکا- 10E/Z,8Z,4E,2E - تترا انوئیک اسیدایزوبوتیل آمیدها، پلی ساکاریدهای محلول در آب، فلاونوئیدهای شبه کوئرستین و کامفرول، اسانس حاوی بورنئول، بورنیل استات، پنتا دکا ۸- ان ۲-اون، اسید پالمیتیک و ترکیبات دیگر می باشد. تحقیقات نشان داده اند که مجموعه ترکیبات موجود در گیاه در بروز

اثرات محرک ایمنی آن موثر است که از میان آن ها مشتقات کافئیک اسید، آلکیل آمیدها و پلی ساکاریدها اهمیت ویژه ای دارند(۴۳).



Echinacea purpurea

فلفل سیاه: فلفل سیاه (Black piper) با نام علمی Piper nigrum از خانواده پایپراسه (Piperaceae) می باشد یکی از مهمترین ادویه هایی می باشد که به عنوان چاشنی غذا استفاده می شود(۴۴). فلفل گیاهی است علفی و دارای ساقه و بی کرک است. برخی از ترکیبات ضد میکروبی استخراج شده عبارتند از: ترپینر (Terpinene)، بتاپینن (β -pinene)، آلفا پینن (α -pinene)، لینالئول (linalool) و ترپینئول (Terpineol) (۴۵). فلفل سیاه به عنوان داروی گیاهی به ویژه برای اختلالات گوارشی، یبوست، اسهال و سوءهاضمه به خوبی شناخته شده است (۴۴).

خواص درمانی: در بسیاری از کتب سنتی فلفل به عنوان دارویی برای مشکلات گوارشی توصیه شده است. در مطالعات انجام شده روی فلفل فعالیت آنتی باکتریال، آنتی هیستامین، تحریک آنزیم های هضمی، ترشح

گاستریک اسید، آنتی آندروژنیک، آنتی اکسیدان، کاهنده چربی، القاء رشد و تقویت سیستم ایمنی را مشخص نموده است، همچنین پایپرین (Piperine) که ماده قلیایی فلفل است دارای اثرات ضد آسم، ضد التهاب، ضد آرتريت، ضد تشنج، ضد تومور، آنتی باکتریال و مسکن درد می باشد. در مطالعه ای مروری روی ترکیب فلفل و پایپرین با هم اثرات آنتی اکسیدان، بهبود زخم، القاء انزیم های هضمی، ترشح گاستریک اسید و بایل اسید، ضد تومور و اثرات آنتی متاستاز در بافت های ریه نشان داده شده است (۴۴). در مطالعه مقدم و همکاران اثر مهاری آن بر استافیلوکوک اورئوس نشان داده شده است. نکته حائز اهمیت این است که فلفل سیاه تحت شرایط اقلیمی متفاوت مواد موثر آن تغییر می کند (۴۵).



Piper nigrum

آویشن شیرازی: آویشن با نام علمی (*Zataria multiflora* Boiss) یک گیاه همگونه آویشن (*Thyme*)

از خانواده نعنائیان که تنها در مرکز، جنوب ایران، پاکستان و افغانستان رشد می کند. این گیاه شباهت بسیار زیادی در ترکیبات شیمیایی و دارویی به آویشن (*Thymus vulgaris*) دارد که مطالعات زیادی در طب سنتی روی این گیاه انجام شده است. (*Thym*) در زبان فارسی به معنای آویشن است و چون این گیاه در شیراز که در جنوب ایران است، وجود دارد آویشن شیرازی نام گذاری شده است.

آویشن گیاهی است علفی، دارای شاخه های زیاد و چوبی به ارتفاع ۶۰ تا ۹۰ سانتی متر. ساقه های آویشن پوشیده از کرک و برگ های کوچک زیادی است. برگ های آن کوچک، لوزی شکل، نوک تیز و به صورت متقابل، بر روی ساقه قرار دارند. این برگ ها به رنگ خاکستری روشن و با بوی بسیار نافذ است و دارای دم برگ های کوچکی نیز می باشد. گل ها کوچک، گلی رنگ و یا سفید و به صورت مجتمع در انتهای ساقه قرار گرفته اند. قسمت مورد استفاده ی گیاه، گل و به ویژه برگ های آن است.

خواص درمانی: اندام های هوایی آویشن شیرازی نه تنها به عنوان چاشنی برای غذا استفاده می شود بلکه در طب سنتی به عنوان ضد عفونی کننده، تسکین دهنده درد، ضد نفخ، داروی ضد کرم و ضد اسهال به کار برده می شود. مطالعات دارویی جدید نشان می دهد که آویشن شیرازی دارای رنج وسیعی از اثرات بیولوژیکی است که شامل: ضد باکتری، ضد اسپاسم، ضد درد و ضد التهاب. در حال حاضر شکل های دارویی این گیاه در بازار به شکل شربت، قطره خوراکی، کپسول و کرم های واژینال برای درمان بیماری های مختلف به فروش می رسند. روغن فرار آویشن شیرازی شامل مقدار قابل توجهی از تیمول (*Thymol*) و کارواکرول (*Carvacrol*) که به عنوان عامل ضد میکروب و ضد قارچ به خوبی شناخته شده اند. پی سیمن (*p-cymene*) یکی دیگر از

ترکیبات روغن آویشن شیرازی است. زاتاریل (Zatariol)، زاتاروسید آ (Zataroside A) و زاتاروسید بی (Zataroside B) از مشتقات جدید پی سیمن جدا شده از آویشن شیرازی هستند. لینالول (Linalool)، کاریوفیلن (Caryophyllene)، گاما ترپنین (γ -terpinene) و بورنئول (Borneol) از دیگر ترکیبات اصلی در اسانس روغن آویشن شیرازی هستند. آویشن شیرازی دارای ترکیبات دیگر متعلق به دیگر فراورده های این گیاه است که شامل آلکان های (Alkanes) از قبیل: ان-نان اکوسان (n-noncosane) و ان-هنتریاکونتان (n-hentria(contane) و اسیدهای چرب های از قبیل بهنیک اسید (behenic acid)، لیگنوسریک اسید (Lignoceric acid) و سروتیک اسید (crotic acid) می باشد. این گیاه همچنین شامل ترکیبات کمی از تانن ها (Tannins)، رزین ها (resins) و ساپونین ها (saponins) می باشد. این گیاه دارای چندین کاربرد در طب سنتی است که به عنوان ضد نفخ، تعریق آور، مدر، ضد عفونی کننده، ضد کرم، بی حس کننده، ضد اسپاسم، ضد کرم روده، ضد اسهال، مسکن درد و همچنین در درمان نفخ، سوءهاضمه، سندروم روده تحریک پذیر، تب، زخم، درد مفاصل و استخوان، سردرد، میگرن، تهوع و سرماخوردگی به کار برده می شود (۴۶).



Zataria multiflora boiss

مروری بر آزمایش MTT، اساس تست و کاربرد آن:

[3-(4, 5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2, 5-Diphenyl-2H-Tetrazolium
Bromide = (MTT)]

از تست MTT جهت تعیین رشد سلولی، اثر سیتوتوکسیسیته دارو و حساسیت دارویی استفاده می شود. در بعضی مواقع از این روش صرفاً جهت تعیین و مقایسه مقدار رشد سلول در محیط های مختلف استفاده می شود. اساس این تست تبدیل ماده MTT به نام علمی 3-4-5-Dimethylthiazole به کریستال فورمازان است که مقدار تولید شده این ماده حاکی از فعالیت میتوکندری در سلول های زنده است. در نتیجه مقدار تبدیل این ماده نسبت مستقیمی با تعداد سلول های زنده دارد. این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول های زنده استوار است که MTT قادر به عبور از غشای سلولها میباشد. پس از ورود MTT به سلولهای سالم، حلقه تترازولیوم آن را می شکند و آن را به کریستال های نامحلول فورمازان تبدیل می کند.

حاصل آن تغییر رنگ از زرد به بنفش می باشد. در حالی که در سلولهای مرده این واکنش صورت نمی گیرد. جذب نوری ($\text{Optical Density}=\text{OD}$) این کریستال ها بعد از حل کردن در (dimethylsulfoxide) با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در مقایسه با گروه های کنترل قرائت می شود. این نوع اندازه گیری در محیط برون تنی و در پلیت های سلولی ۹۶ چاهکی کشت سلولی قابل انجام می باشد. در این آزمایش می توان کریستال های فورمازان را با حلال های مختلف حل نمود و مقدار جذب نوری آن را با استفاده از دستگاههای کالریمتر در دو طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر به صورت کمی اندازه گیری کرد. مقدار OD مربوط به سلول های در معرض دارو نسبت به مقدار آن در سلول های مواجهه نشده با دارو نشانه ی نسبت زنده بودن سلول ها در محیط حاوی دارو است. تهیه سریالی از غلظت دارو در چاهک ها و ارزیابی مقادیر زنده بودن سلول نسبت به گروه کنترل و پیاده کردن این مقادیر بر روی نمودار در بدست آوردن استاندارد به نام EC_{50} ($\text{Effective concentration}$) یعنی غلظتی از ماده که باعث جلوگیری از رشد نیمی از ارگانیسم های مربوطه می گردد، استفاده می شود. در مورد سلول های غیر قابل رشد و تقسیم از استاندارد دیگری به نام LD_{50} (Lethal dose) یعنی غلظتی از ماده که باعث مرگ از نیمی از ارگانیسم های مربوطه می گردد استفاده می شود.

فصل دوم

بیان مسئله

مرور متون

اهداف و فرضیات

بیان مسئله:

داروهای سنتتیک علیرغم کارایی فوق العاده در درمان بسیاری از بیماری ها در برخی موارد با محدودیت هایی همراه هستند. به همین جهت امروزه پژوهش بر روی گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها به طور روزافزون رویکرد جهانی دارد و استفاده از گیاه درمانی و داروهایی با منشا گیاهی در سالهای اخیر روبه فزونی است. در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و در نتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران امکان شناسایی مواد موثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آنها به منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد. این کار به ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته اند، اهمیت ویژه ای دارد. برآورد شده است که در حال حاضر حدود ثلث تا نیمی از فراورده های دارویی موجود در امریکا دارای منشا گیاهی است. این استفاده گسترده می تواند به دلایل مختلفی چون کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار به علت توصیه طب سنتی، استفاده نسلهای گذشته، قیمت کمتر گیاهان داروئی و همچنین سازگاری با عملکرد فیزیولوژیک طبیعی بدن انسان باشد (۴۷ و ۴۰). گرایش به پژوهش بر روی گیاهان دارویی در ایران به طور قابل توجهی در دو سه دهه اخیر افزایش یافته است. این گرایش هم به شرایط اقلیمی مناسب کشور برای تکثیر و پرورش انواع گیاهان دارویی و هم پیشینه تاریخی طب سنتی در ایران مربوط می شود. تلاش هایی هم که در این زمینه در سال های اخیر در کشور انجام شده است به تولید فراورده های دارویی منتهی شده است که امروزه فرم تجاری آنها قابل عرضه در داروخانه های کشور می

باشد. داروهای گیاهی عمدتاً برای بیماری‌هایی استفاده می‌شود که استفاده از داروهای سنتتیک با محدودیت‌هایی روبروست. یکی از بیماری‌هایی که درمان آنها با محدودیت‌ها و چالش‌هایی همراه است، توکسوپلاسموز می‌باشد. با توجه به محدودیت‌های داروهای صنعتی در درمان توکسوپلاسموز محققان بدنبال دستیابی به دارویی با اثرات سمیت کمتر هستند. استفاده از گیاهان دارویی یکی از گزینه‌هاست. مطالعات محدودی که در سال‌های اخیر در زمینه اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره‌های گیاهی و فراکشن‌های آنها انجام شده، دلالت بر این دارد که برخی عصاره‌ها و فراکشن‌های گیاهی دارای فعالیت ضد توکسوپلاسمایی خوبی هستند. ما در یک مطالعه مقدماتی نشان دادیم که برخی از عصاره‌های گیاهی بر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما اثر کشندگی دارند. بر اساس این یافته، لازم شد تا مطالعه دقیق‌تری انجام شود که مطالعه حاضر طراحی شد.

مرور متون:

اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی عصاره‌ها و فراکشن‌های گیاهی

مطالعات انجام شده در ایران: در مطالعه شهابی و همکاران (۱۳۸۷)، عصاره هیدروالکلی واسانس خوراکی گیاه زنیان بر کیست‌های ژیا‌ردیا در محیط کشت آزمایشگاهی اثر کشندگی داشت (۴۸). ناطق‌پور و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که عصاره الکلی گلدر به طور معنی‌دار سبب کاهش میزان پارازیتی پلاسمودیوم برگئی در موش‌ها شد (۴۹). در مطالعه براتی و همکاران (۱۳۸۹) عصاره‌های گیاهی آویشن شیرازی، اسپند و مورد به صورت برون‌تنی اثرات ضد لیشمانیایی خوبی داشتند (۵۰). سرشتی و همکاران (۱۳۹۰) نشان دادند که عصاره آبی و اتانولی چای کوهی تا حدودی اثر مهارکنندگی بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس داشت (۵۱). در

مطالعه خلیلی دهکردی و همکاران (۱۳۹۰) عصاره گیاهان افسنتین، بومادران و برگ گردو به طور معنی دار سبب کاهش تعداد تریکوموناس در محیط کشت شد (۵۲). در مطالعه سوزنگر و همکاران (۱۳۹۱) عصاره گیاهان ابوخلسا و بومادران سبب کاهش تعداد انگل در محیط کشت شد (۵۳). در مطالعه دیگر براتی و همکاران (۱۳۸۹) نشان داده شد که عصاره های گیاهی درمنه کوهی در مقایسه با تارتامتیک (داروی کنترل) تنها در غلظت بالا اثر ضد لیشمانیایی خوبی داشت. همچنین، قوزه پنبه اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی از خود نشان داد (۵۴). در مطالعه محرابی و همکاران (۱۳۹۱) بررسی مداخله ای اثر دارویی گیاه ذغال اخته، سیر و ترکیبی از هر دو بر روی اواسیت های انگل کریپتوسپوریدیوم در محیط هنکس انجام شد. در این مطالعه سیر، ذغال اخته و مخلوط این دو گیاه با توجه به افزایش غلظت و مدت اثر آنها، کاهش قابل ملاحظه ای در تعداد انگل ها نشان دادند (۵۵). اثر ضد انگلی گیاه سرخارگل بر روی لیشمانیا توسط هاشمی و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شد. این گیاه بر روی پرو ماستیگوتهای انگل لیشمانیا مازور اثر مهارکنندگی داشت. عصاره خام این گیاه ۱۰۰٪ انگلها را از بین برد (۵۶).

مطالعات انجام شده در سایر کشورها: مطالعات فراوانی در زمینه اثرات عصاره ها و فراکشن های گیاهی در سایر کشورها بر روی انواع تک یاخته ها انجام شده است. به طور مثال، در مطالعه ای که توسط آستولا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد، عصاره الکلی دانه های اسپند در محیط کشت دارای اثر مهار کنندگی بر پلاسمودیم فالسی پاروم بود (۵۷). در مطالعه Patricia و همکاران (۲۰۰۵) دربرزیل اثرات ضد لیشمانیایی ۱۹ عصاره گیاهی از جمله بومادران و فلفل بر روی انگل لیشمانیا آمازونینسیس و تریپانوزوما کروزو به صورت *in vitro* ارزیابی شد. درصد مهار رشد عصاره این گیاهان از ۴۹/۵٪ تا ۹۹٪ متفاوت بود و هیچ اثر سایتوتوکسیتی

روی گلبول های قرمز نشان نداد (۵۸). در سال ۲۰۱۱، Tariku و همکاران گزارش کردند که افسنتین در غلظت های مناسب دارای خاصیت قوی ضد لیشمانیایی است (۵۹)، در سال ۲۰۱۳ در مطالعه منصور (Rym mansour) میوه انگور (*Vitis vinifera*) دارای اثرات ضد لیشمانیایی است (۶۰). Ziegler و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثر ضد مالاریایی آویشن (*Zataria multiflora Boiss*) را نشان دادند (۶۱). Vendrametto و همکاران ۲۰۱۰، اثر ضد لیشمانیایی ترکیبی از برگ فلفل (*Piper regnellii*) نشان دادند (۶۲). El-Ansary AK و همکاران در سال ۲۰۰۷، اثر ضد شistosومایی زردچوبه (*Curcuma longa*) را نشان دادند (۶۳). Mojarab و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثر ضد مالاریایی درمنه کوهی (*Artemisia aucheri Boiss*) نشان دادند (۶۴).

مطالعات انجام شده در مورد اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها و فراکشن های گیاهی: با جستجو در بانک های اطلاعاتی قابل دسترس به ویژه Pubmed تعداد محدودی مطالعه در مورد اثر ضد توکسوپلاسمایی فراورده های گیاهان دارویی بدست آمد که به نتایج آنها در زیر اشاره می شود:

مطالعه خوش زبان و همکاران (۱۳۸۶) تنها گزارشی است که در مجلات پژوهشی فارسی چاپ شده است که در آن موش های BALB/c متعاقب تلقیح داخل صفاقی سویه RH تحت تجویز خوراکی عصاره سیر قرار گرفتند. عصاره سیر باعث افزایش بقاء موش ها و کاهش فراوانی انگل در بافتهای آنها شد. مؤثرترین دوز از نظر افزایش زمان بقاء، ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم عصاره سیر بود (۶۵).

در مطالعه Youn و همکاران (۲۰۰۳) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی ۵ عصاره الکلی گیاهی شامل: تلخ بیان (*Sophora flavescens*)، (*Sinomenium acutum*)، بادلرزان (*Pulsatilla koreana*)، هویج تیغی

(Torilis japonica) و نارون (Ulmus macrocarpa) بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای و نئوسپورا کانینوم در مقایسه با سولفادیازین در محیط کشت سلولی ارزیابی شد که نشان داد به طور کلی T. japonica و S. flavescence مهار کننده بهتری برای هر دو انگل هستند. میزان کاهش تکثیر انگل های مجاورت داده شده با غلظت های ۵/۳۱۲، ۳/۱۵۶ و ۱/۷۸ نانوگرم به ازای هر حفره عصاره T.Japonica در مقایسه با کنترل ها به ترتیب ۹۹/۷، ۹۸ و ۸۰/۸٪ بود. این درصدهای مهاری برای عصاره S. Flavescence به ترتیب ۹۸/۵، ۷۱/۷ و ۷۰/۸ بود (۶۶).

در مطالعه Jones-Brando و همکاران (۲۰۰۶) اثر مهاری چهار مشتق جدید آرتیمی سینین (درمنه) (Artemisinin) بر توکسوپلازما در *in vitro* بررسی شد. در این مطالعه میانگین دوز مهاری (inhibitory dose= ID50 و میانگین دوز توکسیک (Toxic dose= TD50) برای هر یک از ترکیبات بدست آمد. سه تا از ترکیبات آرتیمی سینین در غلظت کمتر از ۱ μg/ml و چهارمی در غلظت بین ۲ و ۳ میکروگرم در میلی لیتر توکسوپلازما را مهار کرد. مقدار آن برای تری متوپریم ۵/۲ μg/ml بود. ترکیبات آرتیمی سینین توکسیسیتی کمتری از تری متوپریم داشتند، به طوری که مشتقات آرتیمی سینین تنها در غلظت های بالاتر از ۱۶۰ μg/ml سیتوتوکسیسیتی نشان دادند و حال آنکه TD50 تری متوپریم معادل ۶۰ μg/ml بود (۶۷).

در مطالعه Choi و همکاران (۲۰۰۸)، فعالیت ضد توکسوپلازمایی عصاره های متانولی ۱۵ گیاه دارویی بر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما در محیط کشت سلولی HeLa در مقایسه با پریمتامین بررسی شد. در این مطالعه عصاره های شیرین بیان (Glycyrrhiza glabra L.)، اگیر ترکی (Acorus gramineus) (Soland) و سرخس نر (Dryopteris crassirhizoma) بیشترین فعالیت ضد توکسوپلازمایی داشتند

Sophora (Selectivity=1.7-2.5) اما توکسیسیته انتخابی نداشتند (EC₅₀=0.11-0.15 mg/ml) flavescens Aiton فعالیت ضد توکسوپلاسمایی (EC₅₀= 0.20mg/ml) و توکسیسیته انتخابی بالایی (Selectivity=4.6) نشان داد. همچنین، Zingiber officinale (زنجبیل) دارای فعالیت بالای ضد توکسوپلاسمایی (EC₅₀= 0.18mg/ml) و سیتوتوکسیسیته آن در مقابل سلول های HeLa (EC₅₀= 1.81 mg/ml) بود. زنجبیل فعالیت قوی ضد توکسوپلاسمایی (Selectivity=10.1) نسبت به پریمتامین (Selectivity=2.1) و اسپیرامایسین (Selectivity=2.5) نشان داد (۶۸). در مطالعه Jiang و همکاران (۲۰۰۸)، اثر ضد توکسوپلاسمایی اولئورپین یا زیتون (Oleuropein) جدا شده از گیاه زبان گنجشک (Fraxinus rhychophylla) در مقایسه با داروهای سولفادیازین و پریمتامین در شرایط in vitro و in vivo ارزیابی شد. اولئورپین در in vitro اثر ضد توکسو پلاسمای خوبی نشان داد. به طوری که selectivity اولئورپین (۸/۹) از سولفادیازین (۳/۸) و پریمتامین (۲/۵) بیشتر بود. در in vivo میزان مهار تکثیر توکسوپلاسمای در صفاق موش های تحت تجویز اولئورپین (۵۵/۴٪) از موش های تحت تجویز سولفادیازین (۸۵/۳٪) کمتر و با موش های تحت تجویز پریمتامین تقریباً یکسان بود. (۶۹). در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره اتری جینکو (Ginkgo biloba sarcotestas) به نام GAS(ginkgolic acid) در in vitro در محیط کشت سلولی (HFF) human foreskin fibroblast ارزیابی شد. اثر GAS در مقایسه با آزیترومایسین در غلظت های ۳/۱۳ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بررسی شد. در این مطالعه غلظت ایمن آزیترومایسین (میزان تکثیر ۹۰٪) برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۱۶۷/۱ و ۱۱۵/۲ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. توکسیسیته GAS برای سلول های HFF کمتر از آزیترومایسین بود. به طوری که غلظت GAS برای میزان تکثیر ۹۰٪ بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به

ترتیب غلظت های ۱۷۲ و ۱۵۴/۶ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. در این مطالعه از $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ و $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ برای ارزیابی DNA توکسوپلازما و سنتز پروتئین استفاده شد. (GAS) قادر بود در تمامی غلظت ها هم سنتز DNA و هم سنتز پروتئین توکسوپلازما را در روش وابسته به زمان مهار کند (۷۰).

در مطالعه De Oliveira و همکاران (۲۰۰۹) اثر دم کرده درمنه خزری یا گیاه گندواش (*Artemisia annua* L) روی حساسیت به عفونت توکسوپلازما در مدل تجربی *in vitro* و *in vivo* ارزیابی شد. در این مطالعه از سلول های HFF برای کشت سلولی استفاده شد. تاکی زوئیت ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه و ۵%CO₂ با رقت های سریال دو برابر دم کرده *A. Annua* (۸۰-۲۵۰۰ μg/ml) یا سولفادیازین (۲۰۰ μg/ml-۱/۵۶) و یا محیط کشت تنها (کنترل) با سلول های مونولایر روی لامل ها انکوبه شدند. در تجربه دیگری، مجاورت پس از ۳ ساعت از آلودگی سلول ها با تاکی زوئیت ها تکرار شد. نتایج به صورت درصد مهار عفونت و تکثیر داخل سلولی انگل برای هر مجاورت نسبت به کنترل بیان شد. میانگین غلظت مهاری (IC₅₀) محاسبه شد. بر اساس نتایج این مطالعه، ویابلیتی سلول های HFF در غلظت های مختلف دم کرده *A. annua* و سولفادیازین، بالای ۷۲٪ بود. مجاورت تاکی زوئیت ها با *A. annua* قبل از عفونت در سلول های HFF منحنی مهاری dose-response نشان داد که به ۷۵٪ مهار رسید که مشابه نتایج بدست آمده با سولفادیازین بود. در تجارب *in vivo* دم کرده *A. annua* کنترل موثری بر سویه کیست ساز توکسوپلازما (ME-49) نشان داد. منحنی بقاء موش های آلوده شده با سویه RH بین موش های تحت تجربه با دم کرده *A. annua* و موش های تحت تجربه با سولفادیازین اختلاف معنی دار نداشت (۷۱).

در مطالعه AL-zanbagi و همکاران (۲۰۰۹) اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره گیاهان فلفل سیاه، فلفل قرمز، دارچین و زردچوبه در *in vivo* بررسی شد. در این مطالعه موش ها با ۲۰۰ تاکی زوئیت سوبه RH به طریق داخل صفاقی آلوده شدند و از ۲۴ ساعت بعد از تلقیح، روزانه تا ۷ روز پس از عفونت تحت تجویز عصاره های آبی و الکلی گیاهان فوق با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم قرار گرفتند. اسپیرامایسین نیز با همین دوز به عنوان داروی رفرنس استفاده شد. با دوز روزانه ۱۰۰ میلی گرم کمترین و بیشترین اثر مهاری عصاره آبی به ترتیب مربوط به فلفل سیاه (۰/۸۱/۲) و زردچوبه (۰/۹۷/۴) بود (درمقایسه با ۰/۷۱٪ برای اسپیرامایسین) (۷۲).

در مطالعه Kavitha و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضد توکسوپلاسمایی چهار فراکشن عصاره ریشه گیاه *Eurycoma longifolia jack* در کشت سلولی Vero cells مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از سوبه RH توکسوپلاسم و غلظت های نهایی ۱۰۰-۱/۵۶ میکروگرم در میلی لیتر فراکشن ها و کلیندامایسین استفاده شد و میانگین غلظت موثره (Effective Concentration=EC50) تعیین گردید. بر اساس نتایج این مطالعه، همه نمونه ها اثر کشندگی بر توکسوپلاسم داشتند و بیشترین اثر کشندگی مربوط به فراکشن TAF 355 بود. EC50 برای کلیندامایسین، ۰/۰۱۶ و برای TAF 355 ، ۰/۳۶۹ بود. همچنین، اثر مهار کنندگی فراکشن های TAF 355 و TAF 401 با افزایش غلظت، افزایش نشان داد (۷۳).

اهداف و فرضیات:

الف-هدف اصلی (General Objective)

تعیین اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی مورد، زردچوبه، سرخارگل، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و فلفل سیاه در محیط کشت سلولی

تعیین اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی مورد، زردچوبه، سرخارگل، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و فلفل سیاه در محیط برون تنی عاری از سلول

ب-اهداف فرعی (Specific Objective)

تعیین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره های گیاهان مورد، زردچوبه، سرخارگل، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و فلفل سیاه در محیط برون تنی عاری از سلول بر حسب دوز عصاره ها

تعیین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره های گیاهان مورد، زردچوبه، سرخارگل، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و فلفل سیاه در محیط برون تنی عاری از سلول بر حسب مدت زمان انکوباسیون

تعیین EC50 عصاره های گیاهان مورد، زردچوبه، سرخارگل، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و فلفل سیاه در مهار توکسوپلازما در کشت سلولی

تعیین Selectivity عصاره های گیاهان مورد، زردچوبه، سرخارگل، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و فلفل سیاه در مهار توکسوپلازما در کشت سلولی

ج-اهداف کاربردی (*Applied Objectives*):

ارزیابی اولیه اثر ضد توکسوپلاسمایی انواع گیاهان دارویی به منظور شناسایی خواص ضد انگلی آنها و نهایتاً بررسی و یافتن مواد موثر آنها در فراکشن ها جهت استفاده به عنوان مواد طبیعی موثر با عوارض جانبی کمتر در پیشگیری یا درمان توکسوپلاسموز.

د-فرضیه ها (*Hypothesis*) یا سؤال های پژوهش:

عصاره های گیاهی مورد، زردچوبه، سرخارگل، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و فلفل سیاه سبب مهار تکثیر تاکی زوئیت ها در کشت سلولی می شوند.

فصل سوم

مواد و روشها

۳-۱: تهیه گیاهان مورد مطالعه و شناسایی آنها: در این مطالعه، اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره

گیاهان مورد، درمنه کوهی، آویشن شیرازی، زردچوبه، سرخارگل و فلفل بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما در محیط *in vitro* و کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان مورد مطالعه توسط متخصص گیاه شناسی جمع آوری و شناسایی شدند و یک نمونه از هر گیاه در پژوهشکده گیاهان دارویی ثبت و نگهداری شد.

۳-۲: تهیه عصاره: عصاره گیری تحت نظارت متخصص فارماکوگنوزی انجام شد. به طور خلاصه، پس از خشک کردن و آسیاب کردن گیاهان، نیم کیلوگرم از آنها ابتدا توسط اتانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره گیری شد. این عمل برای سه بار تکرار گردید و سپس عصاره های حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ شدند. میزان عصاره خشک محاسبه و با انجام آزمایش های مقدماتی، به کمک حلال دی متیل سولفاکساید (Dimethyl sulfoxide= DMSO) غلظت های متفاوت از گیاهان تهیه شد.

۳-۳: تهیه و نگهداری سویه توکسوپلاسمما گوندی ای: در مطالعه حاضر از سویه RH توکسوپلاسمما گوندی ای استفاده شد. این سویه به طور دوستانه از گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید و در آزمایشگاه از طریق پاساژ های داخل صفاقی در موش های سوری تکثیر و نگه داری شد.

۳-۴: ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی: اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها در شرایط برون تنی عاری از سلول و در کشت سلولی انجام شد:

۳-۴-۱: اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول

در مطالعه حاضر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما گوندی ای در داخل میکروتیوپ با عصاره اتانولی ۶ گیاه مورد، درمنه کوهی، زردچوبه، آویشن شیرازی، سرخارگل و فلفل مجاورت داده شدند و اثر کشندگی آنها بر انگل ارزیابی شد.

۲-۴-۳: تهیه و آماده سازی عصاره های گیاهی:

مواد و وسایل مورد نیاز :

عصاره اتانولی گیاه، ظرف شیشه ای اپلیکاتور، قاشق فلزی، شعله، ترازوی دیجیتال، آب مقطر و DMSO و PBS.

تهیه بافر فسفات سالین (PBS)

از این بافر برای شستشوی سلولها و تهیه برخی از محلولها استفاده گردید. برای تهیه این بافر مقادیر زیر با ترازوی دیجیتال وزن کرده و به تدریج با افزودن آب مقطر دیونیزه تا حجم ۹۵۰ حل کرده و پس از تنظیم نمودن PH (۷/۴-۷/۲) با سود یا اسید کلریدریک ۱ نرمال، محلول به حجم یک لیتر رسید.

KCl (Merck)	0.2 gram
NaCl(Merck)	8 gram
(12H ₂ O) Na ₂ HPO ₄	1/15 gram
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0/2 gram

۳-۴-۳: تهیه غلظت های مختلف از عصاره ها:

از هر یک از عصاره ها غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر به روش زیر تهیه شد: یک گرم از هر عصاره را با ترازو وزن کرده و در ظرف شیشه ای ریخته سپس توسط قاشقک فلزی در کنار شعله با اضافه کردن تدریجی یک میلی لیتر 1% DMSO در PBS (PH 7.2, 0.15 M) کاملاً حل گردید (mg/ml ۱۰۰۰). این غلظت از عصاره به عنوان ذخیره (Stock) در دمای ۴ درجه نگه داری شد. از این غلظت ذخیره، با استفاده از PBS غلظت های فوق تهیه شد. برای تهیه غلظت ۲۰۰، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره با ۸۰۰ میکرولیتر از PBS، برای تهیه غلظت ۱۰۰، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره با ۹۰۰ میکرولیتر از PBS، برای تهیه غلظت ۵۰، ۵۰ میکرولیتر از محلول ذخیره با ۹۵۰ میکرولیتر از PBS، برای تهیه غلظت ۱۰، ۱۰ میکرولیتر از محلول ذخیره با ۹۹۰ میکرولیتر از PBS را در میکروتیوپ حل می کنیم.

۳-۴-۴: تکثیر و آماده سازی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای:

مواد و وسایل مورد نیاز: سرنگ انسولین، سرنگ معمولی در اندازه های دو، ده و بیست و پنج میلی لیتری، گازاستریل، ماسک، دستکش لاتکس، دستکش یکبار مصرف، لام، لامل، لام نئوبار، پیت پاستور، پیت های شیشه ای، لوله فالكون ۱۵ و ۵۰ میلی لیتری.

روش اجرا: در هر بار برای تکثیر و جمع آوری تاکی زوئیت ها، حدود ۱۰^۶ تاکی زوئیت تازه به طریق داخل صفاقی به ۳-۴ موش تلقیح شد. حدود ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، تاکی زوئیت های تکثیر یافته در صفاق موش ها از طریق شستشوی حفره صفاقی با سرم فیزیولوژی جمع آوری شدند. تاکی زوئیت های جمع آوری شده به

داخل لوله سانتریفیوژ استریل منتقل و سه بار با استفاده از PBS (Phosphate buffer saline) شستشو شدند. در مرحله بعد به منظور بالا بردن درصد خلوص تاکی زوئیت ها و خارج کردن سلول های صفاقی، سوسپانسیونی از رسوب تهیه و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰g سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی به لوله دیگری منتقل و با دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ PBS اضافه شد و مجدداً سوسپانسیون یکنواختی تهیه شد. تعداد تاکی زوئیت ها در سوسپانسیون با استفاده از لام نئوبار شمارش شد و با استفاده از PBS سوسپانسیون حاوی 10^7 تاکی زوئیت در میلی لیتر تهیه شد. از این سوسپانسیون برای ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها در شرایط برون تنی عاری از دودمان سلولی استفاده شد.

۵-۴-۳: تهیه و آماده سازی رنگ متیلن بلو قلیایی:

این رنگ بر اساس پروتکل ارائه شده توسط جانسون و هولیمن (۷۴) تهیه شد:

مواد مورد نیاز : پودر تترابورات سدیم، پودر کربنات سدیم، پودر متیلن بلو، الکل اتیلیک مطلق، آب دیونیزه، بالن، ترازو دیجیتال، PH متر، کاغذ صافی.

روش تهیه رنگ متیلن بلو:

مقدار ۰/۰۲۸ گرم از پودر تترابورات سدیم به همراه حدود ۰/۲۵ گرم پودر کربنات سدیم در بالن ریخته و با اضافه کردن تدریجی ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه پودرها کاملاً حل شد. در مرحله بعد مقدار ۰/۰۳۲ گرم از پودر متیلن بلو در ۲ میلی لیتر الکل اتیلیک مطلق حل و پس از عبور از کاغذ صافی، با محلول فوق به خوبی

مخلوط شد. سپس PH محلول فوق در ظرف با PH متر سنجیده شد و روی ۱۱ PH تنظیم شد. محلول

آماده شده در ظرف تیره پوشانده شده با فویل ریخته و در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۳-۴-۶: مجاورت عصاره های گیاهی با تاکی زوئیت ها و تعیین درصد مرگ سلولی:

مواد و وسایل مورد نیاز: سمپلر و سر سمپلر در اندازه های مختلف، میکروتیوپ، ساعت، لام، لامل، رنگ متیلن بلو، میکروسکوپ.

روش اجرا: در این مرحله ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت ها با ۵۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف عصاره ها در داخل میکروتیوپ در دمای آزمایشگاه مجاورت داده شد. هر یک از غلظت ها به طور جداگانه در مدت زمان های ۱۰،۳۰،۴۵ دقیقه با تاکی زوئیت ها مجاورت داده شدند. در پایان هر زمان انکوباسیون، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت ها پس از مخلوط کردن به سطح لام منتقل و با افزودن ۵ میکرولیتر رنگ آبی متیلن مخلوط گردید و با لامل پوشانده شد. بعد از ۲-۳ دقیقه میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها تعیین شد. بدین ترتیب که حدود ۲۵۰-۳۰۰ تاکی زوئیت با درشت نمایی $\times 400$ شمارش و نسبت تعداد تاکی زوئیت های کشته شده (رنگ نگرفته) به تعداد کل تاکی زوئیت ها برای هر یک از عصاره ها در غلظت ها و زمان های مختلف انکوباسیون برآورد شد. از سوسپانسیون تاکی زوئیت ها در PBS و سوسپانسیون تاکی زوئیت ها در DMSO به عنوان کنترل استفاده شد. تمامی تجارب به صورت سه گانه انجام و سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار برای هر مورد تعیین گردید.

۷-۴-۳: زیست سنجی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها در موش:

از روش زیست سنجی در موش برای تایید ۱۰۰٪ اثر کشندگی عصاره ها بر تاکی زوئیت ها استفاده شد. در این مطالعه، حداقل غلظتی از هر عصاره که در کمترین مدت زمان انکوباسیون، ۱۰۰٪ اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها داشت، به این روش مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور به سه موش و هر کدام ۵۰ میکرولیتر از نمونه مجاورت داده شده با عصاره به طریق داخل صفاقی تزریق شد. موش ها تا یک ماه روزانه تحت نظر قرار گرفتند تا اگر کز کردند و تحرکشان به طور قابل توجهی کاسته شد، از نظر تاکی زوئیت ها در مایع صفاقی بررسی شوند. همزمان به موش کنترل، تاکی زوئیت های بدون مجاورت با عصاره تلقیح شد.

۵-۳: اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در کشت سلولی:

۱-۵-۳: دودمان سلولی مورد استفاده، تهیه، تکثیر و نگهداری آن:

تهیه دودمان سلولی: در این مطالعه برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها بر تاکی زوئیت ها در کشت سلولی از سلول های هلا (Hela) استفاده شد. این سلول ها از انستیتو پاستور ایران خریداری و با استفاده از فلاسک 25 میلی لیتری حاوی مواد مغذی به دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند.

تکثیر و نگهداری دودمان سلولی:

مواد و وسایل مورد نیاز: سرنگ انسولین، سرنگ معمولی در اندازه های دو، پنج و ده میلی لیتری، گازاستریل، ماسک، دستکش لاتکس و دستکش یکبار مصرف، لام، لامل، لام نئوبار، پیت پاستور، پیت های شیشه ای، لوله

فالکون ۱۵ و ۵۰ میلی لیتری، ظروف شیشه ای آزمایشگاهی مانند بالن ژوژه، پتريدش، استوانه مدرج، ارلن، بشر، سمپلر و سر سمپلر در اندازه های مختلف، میکروپلیت ۹۶ خانه ای ته صاف.

۲-۵-۳: محلول های مورد نیاز:

L- گلوتامین (۲ میلی مولار): ۰/۶ گرم از از پودر ال-گلوتامین داخل ارلن با ۲۰ سی سی PBS کاملاً حل گردید و مایع شفاف حاصل شد. سپس در زیر هود توسط فیلتر سر سرنگی استریل و در میکروتیوپ های استریل در حجم های ۱ میلی لیتر تقسیم و در ۲۰- نکه داری شد (برای هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت، ۰/۵ میلی لیتر ال- گلوتامین استفاده شد).

پن استریپ: به صورت تجاری و آماده با دوز ۱۰۰۰۰ واحد از شرکت Gipco آلمان خریداری شد. به ازاء هر ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت، مقدار ۵۰ میکرولیتر پن استریپ استفاده شد.

محلول رنگ آمیزی تریپان بلو: این رنگ جهت تعیین درصد حیات سلول های جدا شده مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه رنگ به ترتیب زیر عمل شد: محلول حاصله قبل از استفاده از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد.

تریپان بلو	۰/۰۴ گرم
بافر فسفات سالین	۱۰ میلی لیتر

در این روش سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱ با محلول رنگ مخلوط و در عرض ۵-۱۰ دقیقه زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 40$ درصد سلول های رنگ نگرفته (زنده) شمارش شدند.

تهیه محیط مغذی برای کشت سلول: در یک فالكون استریل در زیر هود، ۴۵ میلی لیتر RPMI 1640

ریخته و سپس ۵ میلی لیتر FBS به آن اضافه شد. سپس ۱ میلی لیتر ال-گلوتامین و ۲۵۰ میکرولیتر پن استرپ به آن اضافه گردید. درب فالكون را بسته و با پارافیل کاملاً پوشانده شد تا مانع تبخیر شود. از این محیط برای پاساز سلول ها و تعویض محیط کشت سلولی استفاده شد. این محیط در ۴ درجه نگهداری شد.

شمارش سلول های هلا و تعیین ویابلیتی سلول ها: پس از تریپسینه کردن فلاسک کشت،

سوسپانسیون سلولی ۲ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در دور $1500g$ سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ته فالكون با پیپت پاستور به آرامی پیپتاژ شد تا یک سوسپانسیون یک دست از سلول های هلا بدست آید و سلول ها آسیب نبینند. در مرحله بعد، $10\mu l$ از سوسپانسیون سلولی همراه با $10\mu l$ از محلول رنگ آمیزی تریپان بلو ۰.۴٪ داخل میکروتیوپ استریل اضافه کرده و به آرامی با هم مخلوط شدند. برای تعیین درصد ویابلیتی، تعداد سلول های مرده (رنگ گرفته) و سلول زنده (رنگ نگرفته) با استفاده از لام نئوبار در خانه های WBC شمارش و با استفاده از فرمول زیر درصد ویابلیتی (Viability) سلول ها تعیین شد. پس از شمارش سلولی با استفاده از RPMI 1640، رقتی از سلول ها تهیه شد که در هر ۱۰۰ میکرولیتر آن حاوی ۶۰۰۰۰ سلول بود.

فرمول شمارش سلول های Hela :

حجم سوسپانسیون $\times 10^4 \times 2 \times$ (ضریب رقت) \times تعداد سلوها در مربع ۱۶ تایی - تعداد کل سلول ها

فرمول محاسبه Viability :

$$\text{Viability} = \frac{[\text{سلول های زنده و مرده}] \times 100}{\text{تعداد سلول های زنده}}$$

۳-۵-۳: آماده سازی تاکای زوئیت ها:

تاکای زوئیت های تکثیر یافته در موش ها (مطابق روش ۴-۴-۳) بعد از ۷۲ ساعت جمع آوری شدند. پس از سانتریفیوژ، از رسوب با استفاده از PBS PH 7.2, 0.15 M سوسپانسیون تهیه شد و ۵ دقیقه در دور ۲۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی را جمع آوری کرده و به داخل لوله دیگر ریخته و با دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله، مایع رویی را دور ریخته و به رسوب، RPMI1640 بدون FBS اضافه گردید. و زنده بودن انگل ها با تست تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس توسط لام نئوبار تعداد انگل ها را محاسبه کرده و با دادن رقت با PBS تعداد مورد نیاز آزمایش که 3×10^7 بود به دست آمد. برای محاسبه و شمارش بر روی لام نئوبار از ۴ خانه اطراف لام نئوبار که محل شمارش WBC است استفاده شد.

۳-۵-۴: آماده سازی عصاره ها برای مجاورت با تاکای زوئیت ها در کشت سلولی:

تهیه غلظت ذخیره (stock): مقدار ۰/۰۲ گرم (۲۰ میلی گرم) هر عصاره با اضافه کردن تدریجی یک میلی لیتر RPMI 1640 و ۱٪ DMSO کاملاً حل گردید و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری به عنوان Stock نگهداری شد.

تهیه غلظت های عصاره: از محلول ذخیره، با استفاده از RPMI 1640 غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان غلظت های کار (غلظت هایی از هر عصاره که با تاکی زوئیت ها مجاورت داده شد) تهیه شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول ذخیره به نسبت ۱ به ۲۰ با RPMI 1640 رقیق شد (غلظت ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) و سپس رقت های سریال ۲ برابر از این غلظت تهیه شد که شامل غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰ بود.

۵-۳-۵: تهیه و آماده سازی داروی پریمتامین:

الف- پودر پریمتامین با خلوص ۹۸ درصد به وزن ۲۵۰ میلی گرم از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد. این دارو به نسبت ۱:۱ با حلال (اتانول-استن) حل و غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر از دارو بدست آمد (۷۵). از این غلظت به عنوان محلول ذخیره، ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ به عنوان غلظت های کار تهیه شد.

ب- تهیه غلظت های کار پریمتامین:

برای تهیه غلظت های کار به ترتیب زیر عمل شد: از محلول ذخیره میزان ۱ میلی لیتر برداشته و با ۹ میلی لیتر محیط کشت RPMI 1640 مخلوط گردید ($1\mu\text{g/ml}$). از این محلول، مقدار ۱ میلی لیتر برداشته و با ۹ میلی

لیتر محیط کشت RPMI 1640 مخلوط گردید ($0.1 \mu\text{g/ml}$). غلظت ده برابر بعدی ($1 \mu\text{g/ml}$) نیز به همین ترتیب تهیه شد.

۳-۵-۶: مجاورت عصاره های گیاهی و داروی پریمتامین با تاکی زوئیت ها:

$100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون حاوی 6×10^4 تاکی زوئیت توکسوپلازما به هر چاهک میکروپلیت های ۹۶ خانه ای اضافه شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C تحت شرایط $5\% \text{CO}_2$ قرار گرفتند. بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت، سلول های هلا از نظر چسبندگی و زنده بودن با میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت های تهیه شده به روش ۴-۴-۳ حاوی 3×10^5 تاکی زوئیت به هر چاهک اضافه شد (نسبت تاکی زوئیت به سلول ۵ به ۱ بود) (۷۳ و ۶۸). پس از افزودن تاکی زوئیت ها، بلافاصله میکروپلیت در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد و تحت شرایط $5\% \text{CO}_2$ به مدت ۶ ساعت قرار گرفت. بعد از این مدت محیط رویی میکروپلیت توسط مولتی سمپلر تخلیه و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط مغزی RPMI 1640 جایگزین شد (این مرحله به منظور حذف تاکی زوئیت های خارج سلولی انجام شد). سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تحت شرایط فوق نگهداری شد. بعد از این مدت بر اساس چارت زیر غلظت های مختلف عصاره ها و دارو (به عنوان کنترل) به چاهک ها اضافه شد و دوباره انکوباسیون با شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت تکرار شد. بعد از خاتمه انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از محلول کیت MTT (Sigma) ایده زیست نو ترکیب) به هر چاهک افزوده شد و سپس به مدت ۴ ساعت در شرایط مشابه انکوبه شد (تا بلورهای فورمازان نمایان شوند).

چارت مجاورت تاکی زوئیت ها با غلظت های مختلف عصاره ها و دارو در کشت سلول:

C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C2	C4	C6		HTE2	HTE4	HE2	HE4				
C2	C4	C6		HTE2	HTE4	HE2	HE4				
C2	C4	C6		HTE2	HTE4	HE2	HE4				

C1=Hela+RPMI 1640; C2=DMSO+Hela+RPMI 1640; C3=Hela+Tachyzoite+drug 10µg/ml;
 C4=Tachyzoite+drug 1µg/ml; C5=Tachyzoite+drug 0.1µg/ml; C6=Tachyzoite+drug 0.01µg/ml;
 C7=DMSO+Hela+tachyzoite; HE 1= Hela+extract 400 µg/ml; HE 2= Hela+extract 200 µg/ml;
 HE 3= Hela+extract 100 µg/ml; HE 4= Hela+extract 50 µg/ml; HTE 1= Hela+tachyzoite+extract
 400 µg/ml; HTE 2= Hela+tachyzoite+extract 200 µg/ml; HTE 3= Hela+tachyzoite+extract 100
 µg/ml; HTE 4= Hela+tachyzoite+extract 50 µg/ml

۳-۵-۷: سنجش اثر سایتوتوکسیسیتی با روش **MTT**

مواد مورد نیاز: پودر MTT، بافر PBS، DMSO

طرز تهیه محلول MTT: ۲۵ میلی گرم پودر زرد رنگ MTT در ۵ میلی لیتر RPMI 1640 حل شد (۵mg/ml). پس از حل شدن کامل پودر، محلول در زیر هود با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲µm فیلتر شد تا هم استریل شود و هم ذرات نامحلول احتمالی موجود در آن حذف شود. این محلول استریل در حجمهای یک میلی لیتری تقسیم و در ظرف های مخصوص کیت در تاریکی و دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. در موقع نیاز، محلول از فریز خارج و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا ذوب شود. لازم به ذکر است که تمام مراحل ساخت محلول مذکور و استریلیزاسیون آن در شرایط تاریکی و داخل هود انجام شد.

روش انجام آزمایش MTT: پس از خاتمه انکوباسیون نمونه ها با محلول MTT، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از DMSO کیت افزوده و کاملاً با پیپت مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. در نهایت دانسیته نوری (Optical Density=OD) نمونه ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر الایزا (Epoch, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر قرائت شد.

با استفاده از OD های بدست آمده، Viability، EC50 و Selectivity محاسبه شد.

$$\text{Viability} = [\text{کل سلول ها} / \text{تعداد سلول های زنده}] \times 100$$

$$\text{Selectivity} = \text{EC50 Hela cell} / \text{EC50 Toxoplasma RH strain}$$

$$\text{EC50} = \text{median effective concentration}$$

EC50 با توجه به OD های بدست آمده و با استفاده از نرم افزار Prism محاسبه شد.

تمامی تجارب به صورت سه گانه انجام و سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار برای هر مورد تعیین گردید.

آنالیز آماری: علاوه بر آمار توصیفی از آزمون های ANOVA، توکی، کروسکال والیس و کولموگروف-اسمیرنف با نرم افزار SPSS-16 برای آنالیز داده ها استفاده شد و سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی محدود به کار با موش های آزمایشگاهی بود. تلاش شد، موش ها در شرایط مناسب حیوانخانه ای نگهداری شوند و برای کشتن آنها از تزریق کتامین و زایلازین استفاده شد.

فصل چہارم

نتائج

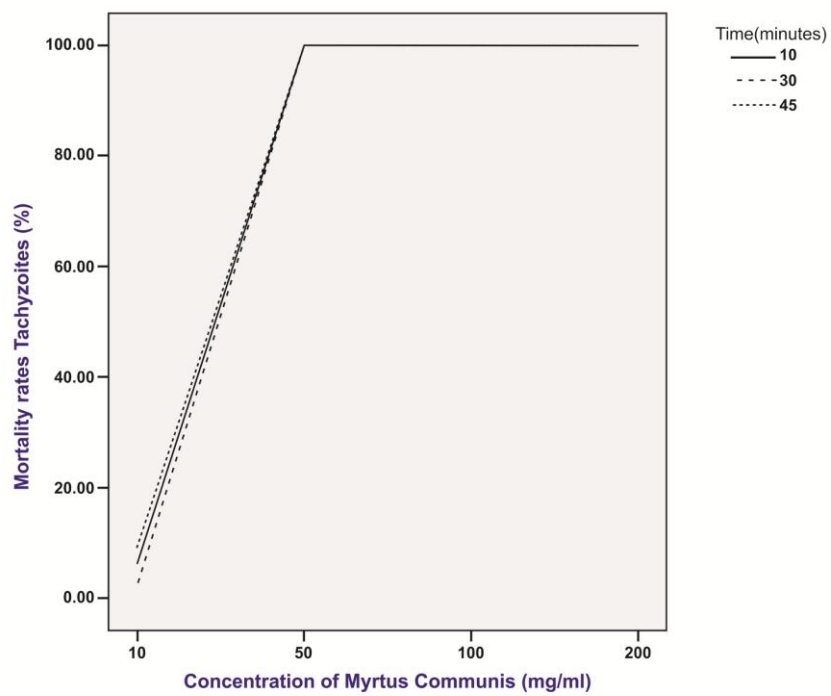
اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره مورد: عصاره مورد در غلظت های مختلف دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف مورد در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه مورد در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره مورد (میلی گرم/ میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	(دقیقه)
$2/5 \pm 0/9$	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰
$5/91 \pm 1/5$	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳۰
$8/9 \pm 1/6$	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی عصاره مورد در غلظت ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر با افزایش مدت زمان انکوباسیون ، افزایش معنی دار را نشان داد ($P<0.001$)



شکل ۱. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ (میلی گرم/ میلی لیتر) عصاره مورد در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

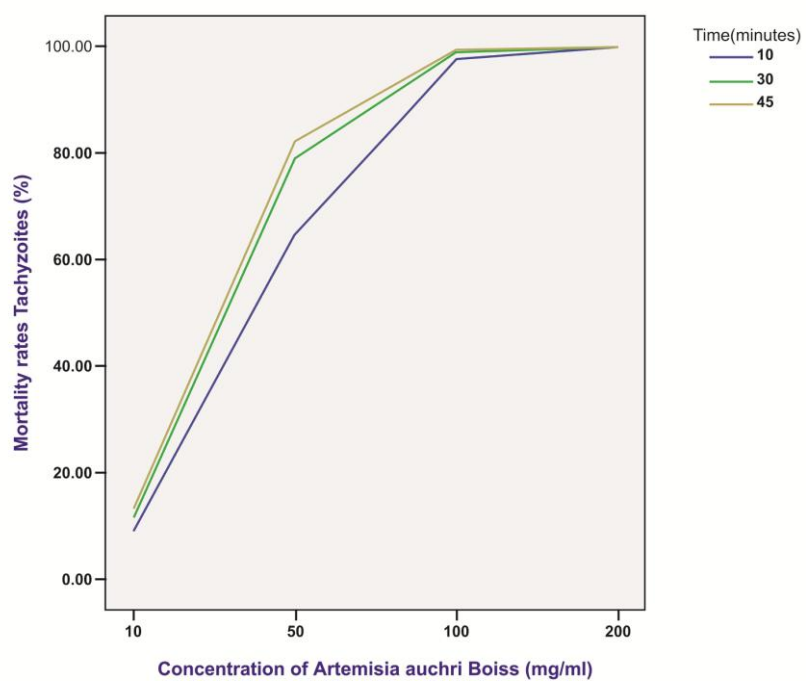
مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره درمنه کوهی: عصاره درمنه کوهی در غلظت های مختلف دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف درمنه کوهی در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۲ و شکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه درمنه کوهی در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره درمنه کوهی (میلی گرم / میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
۹/۰ ± ۲/۴	۶۴/۸ ± ۱۲/۲	۹۷/۶ ± ۲/۳	۱۰۰	۱۰
۱۱/۴ ± ۳/۰	۷۹/۱ ± ۷/۰	۹۸/۹ ± ۰/۸	۱۰۰	۳۰
۱۳/۲ ± ۲/۸	۸۲/۳ ± ۴/۰	۹۹/۴ ± ۰/۵	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی عصاره درمنه کوهی با افزایش غلظت، افزایش معنی دار نشان داد ($P<0.001$).

میزان کشندگی هر یک از غلظت های ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر به طور جداگانه در مدت زمان های مختلف انکوباسیون تفاوت معنی دار نشان نداد ولی در هر یک از مدت زمان های انکوباسیون، درصد مورتالیتی با افزایش غلظت افزایش معنی دار نشان داد ($P<0.001$).



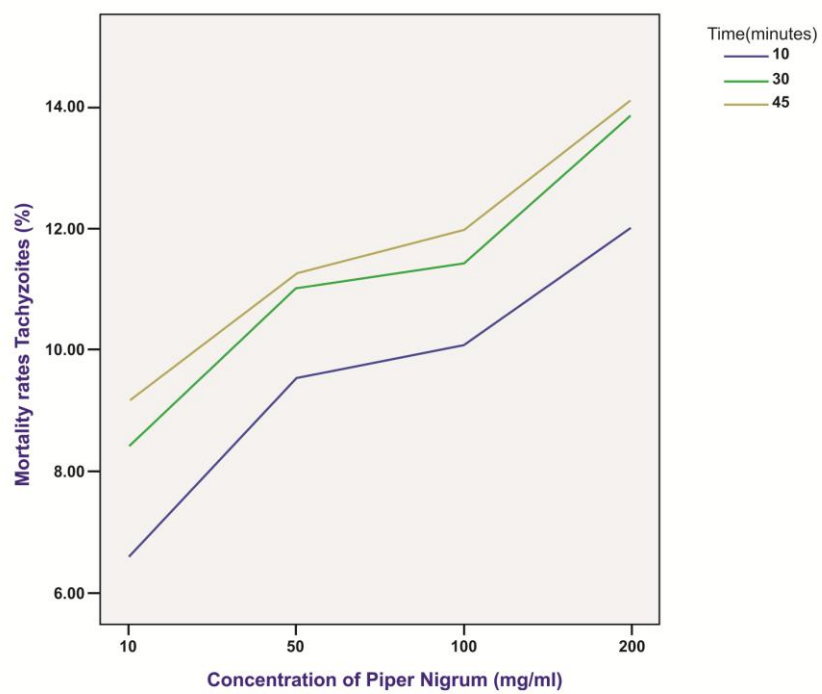
شکل ۲. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره درمنه کوهی در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره فلفل سیاه: عصاره فلفل سیاه در تمامی غلظت ها فاقد اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف فلفل سیاه در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۳ و شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه فلفل سیاه در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره فلفل سیاه (میلی گرم/ میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
$6/5 \pm 2/2$	$9/0 \pm 2/3$	$10/0 \pm 2/1$	$12/0 \pm 3/1$	۱۰
$8/4 \pm 1/3$	$11/0 \pm 2/4$	$11/3 \pm 3/3$	$13/8 \pm 3/23$	۳۰
$9/1 \pm 1/6$	$11/2 \pm 2/7$	$11/9 \pm 3/1$	$14/1 \pm 2/5$	۴۵

میزان کشندگی با غلظت ثابت عصاره در مدت زمان های مختلف تفاوت معنی دار نشان نداد ولی با مدت زمان ثابت انکوباسیون در غلظت های مختلف درصد کشندگی تفاوت معنی دار نشان داد ($P<0.001$).



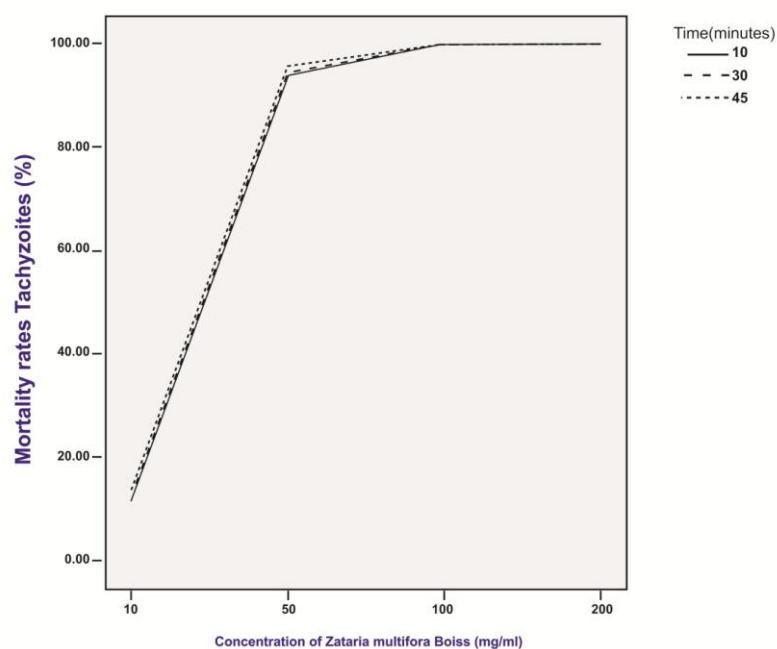
شکل ۳. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره فلفل سیاه در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره آویشن شیرازی: میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت مختلف آویشن شیرازی در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۴ و شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه آویشن شیرازی در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره آویشن شیرازی (میلی گرم/ میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
$11/3 \pm 2/3$	$94/0 \pm 1/1$	۱۰۰	۱۰۰	۱۰
$13/3 \pm 2/8$	$94/4 \pm 1/2$	۱۰۰	۱۰۰	۳۰
$13/7 \pm 6/9$	$95/5 \pm 0/8$	۱۰۰	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی در غلظت های ۱۰ و ۵۰ با افزایش زمان انکوباسیون افزایش معنی داری نشان داد و همچنین بین غلظت های ۱۰ و ۵۰ در زمان های ثابت انکوباسیون تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0/001$).



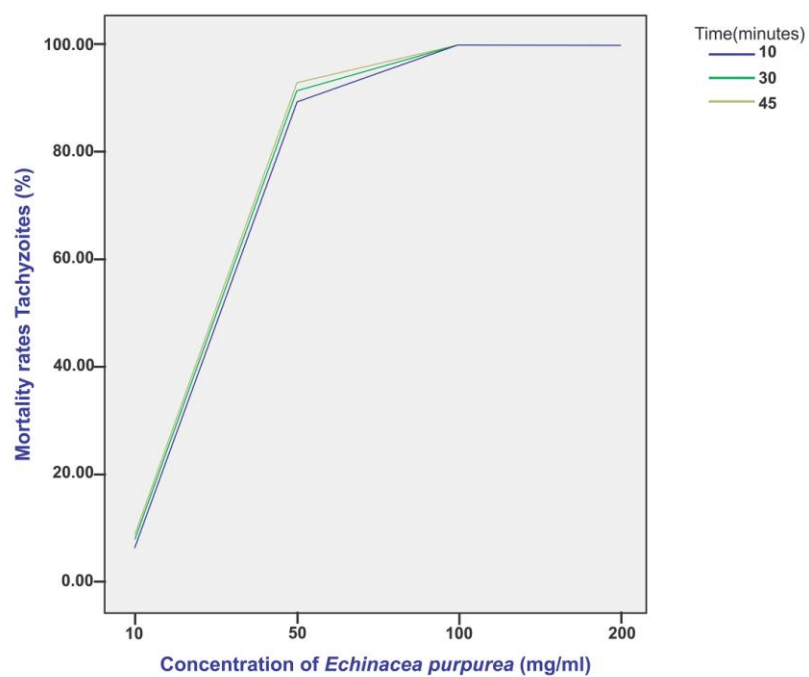
شکل ۴. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره آویشن شیرازی در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره سرخارگل: میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت مختلف سرخارگل در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۵ و شکل ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه سرخارگل در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره سرخارگل (میلی گرم / میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
$6/0 \pm 1/15$	$89/3 \pm 2/5$	۱۰۰	۱۰۰	۱۰
$7/7 \pm 1/33$	$91/44 \pm 2/9$	۱۰۰	۱۰۰	۳۰
$8/5 \pm 1/7$	$92/8 \pm 3/0$	۱۰۰	۱۰۰	۴۵

میزان کشندگی در غلظت های ۱۰ و ۵۰ با افزایش زمان انکوباسیون افزایش معنی داری نشان داد و همچنین بین غلظت های ۱۰ و ۵۰ در زمان های ثابت انکوباسیون تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p < 0/05$).



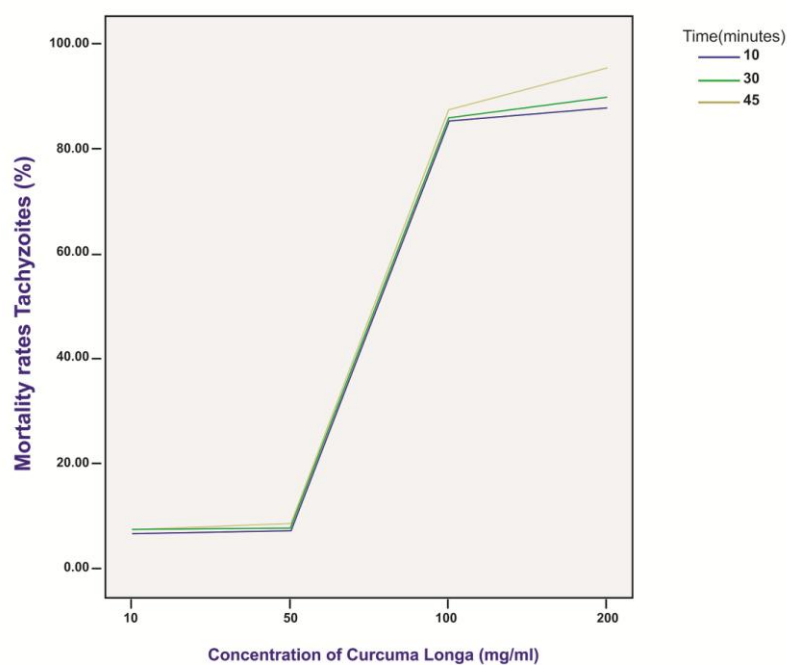
شکل ۵. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره سرخارگل در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره زردچوبه: میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت مختلف زردچوبه در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول ۶ و شکل ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه زردچوبه در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره زردچوبه (میلی گرم/ میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
$6/95 \pm 1/5$	$7/57 \pm 1/0$	$85/63 \pm 2/0$	$88/18 \pm 4/9$	۱۰
$7/75 \pm 1/23$	$7/93 \pm 1/2$	$86/22 \pm 2/3$	$95/21 \pm 9/5$	۳۰
$7/72 \pm 1/45$	$8/85 \pm 2/0$	$87/74 \pm 2/7$	$95/77 \pm 2/1$	۴۵

میزان کشندگی با غلظت ثابت عصاره در مدت زمان های مختلف تفاوت معنی دار نشان نداد ولی با مدت زمان ثابت انکوباسیون در غلظت های مختلف درصد کشندگی تفاوت معنی دار نشان داد ($p < 0/001$).



شکل ۶. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر عصاره زردچوبه در مدت زمان ۱۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه

جدول ۷. نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه چند گانه

عصاره	مورد	درمنه کوهی	آویشن شیرازی	سرخارگل	زردچوبه
فلفل	S	S	S	S	NS
مورد		NS	S	NS	S
درمنه کوهی			S	NS	S
آویشن شیرازی				S	S
سرخارگل					S

S: sig($P < 0.05$) , NS: no sig

نتایج زیست سنجی در موش:

تاکی زوئیت هایی که در محیط عاری از سلول با عصاره ها مجاورت داده شده بودند و به روش رنگ آمیزی با متیلین بلو ۱۰۰ درصد مرگ و میر داشتند، پس از زیست سنجی در موش ها، تمامی آنها تا یک ماه پس از تلقیح زنده ماندند که تایید ۱۰۰ درصد مرگ و میر تاکی زوئیت ها بود.

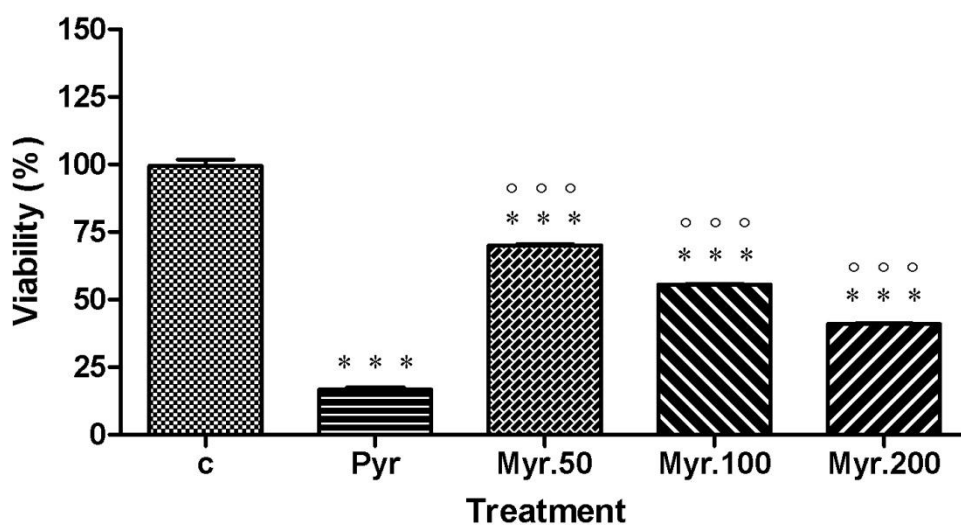
اثر مهاری عصاره های گیاهی بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی:

چهار عصاره مورد، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و سرخارگل دارای اثر مهاری بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی بودند. EC50 و Selectivity هر یک از این عصاره ها بر تاکی زوئیت ها در جدول شماره ۸ و شکل های ۹-۷ نشان داده شده است.

جدول ۸. اثر مهاری عصاره های اتانولی گیاهان مورد، درمنه کوهی، آویشن شیرازی و سرخارگل بر تاکی زوئیت های توکسو پلازما گوندی ای در کشت سلولی HeLa

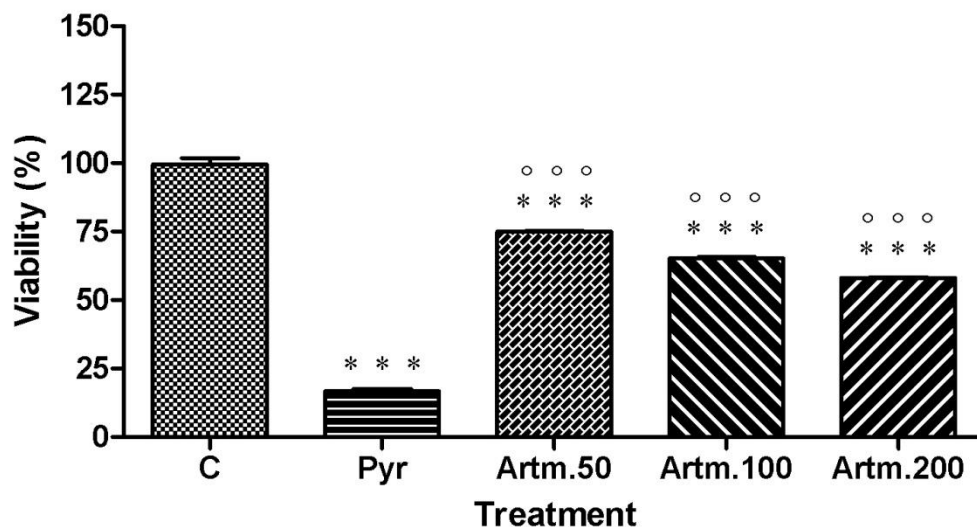
Herbal Extract/Drug	EC50 (µg/ml)		Selectivity ^α
	HeLa	HeLa + TOXO	
<i>Myrtus communis</i> مورد	111.0	122.0	0.90
<i>Artemisia aucheri</i> <i>Boiss</i> درمنه کوهی	130.2	131	0.99
<i>Zataria multiflora</i> آویشن شیرازی	120.0	87.08	1.37
<i>Echinacea purpurea</i> سرخارگل	97.50	84/70	1.15
Pyrimethamine	0.6	0.176	3.40

EC50, median effective concentration; α = Ratio of the EC50 value for HeLa cells to the EC50 value for *T. gondii* RH strain.



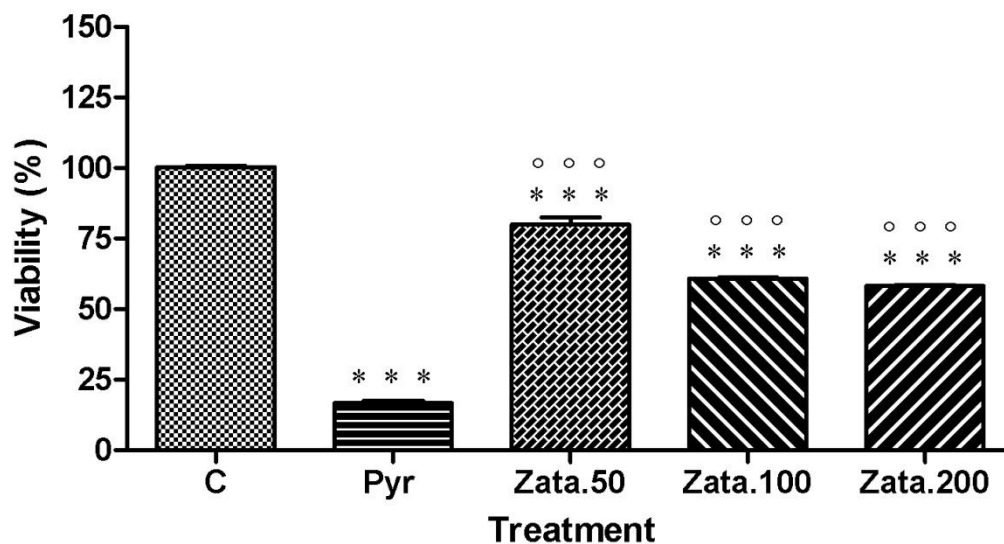
شکل ۷. مقایسه میزان ویابیلیتی تاکی زوئیت ها در کشت سلولی Hela در غلظت های مختلف عصاره های مورد و داروی پیریمتامین در مقایسه با کنترل. C = کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت) = Pyr = پیریمتامین (1µg/ml) = مورد در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ µg/ml؛ *** $P < 0.001$ ، مقایسه گروه ها با کنترل؛ $P < 0.001$ ، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره مورد با داروی پیریمتامین.

همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، عصاره مورد به صورت وابسته به دوز در غلظت های ۵۰-۲۰۰ میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$).



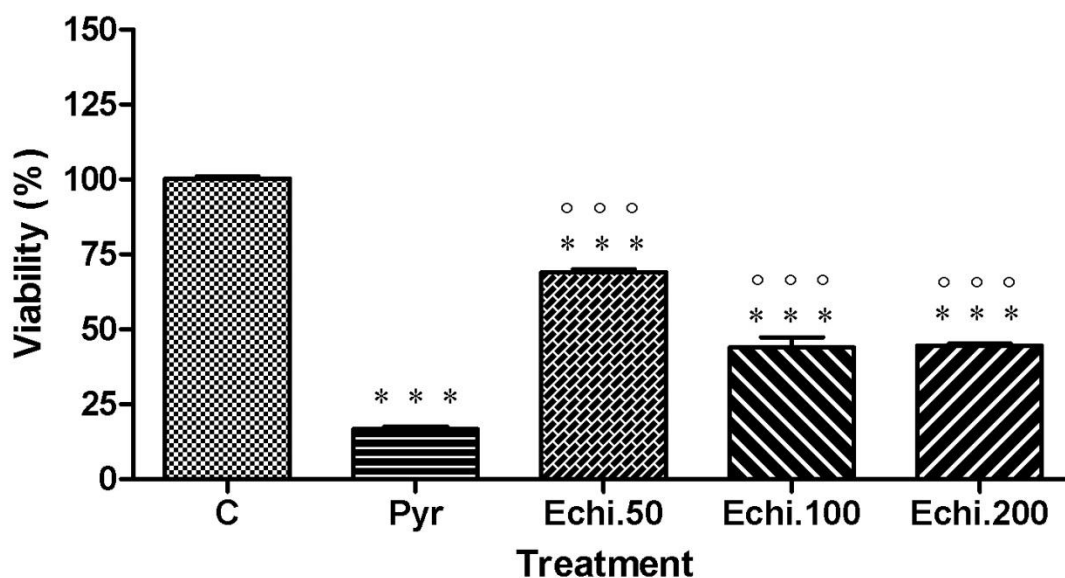
شکل ۸. مقایسه میزان ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره درمنه کوهی و داروی پیریمتامین در سلول های هلا آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل. C= کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت) =Pyr پیریمتامین (۱ μg/ml)؛ Artm= درمنه کوهی در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ μg/ml. *** $P<0.001$ ، مقایسه گروه ها با کنترل؛ $P<0.001$ ، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره درمنه کوهی با داروی پیریمتامین.

همانطور که در شکل ۸ نشان داده شده است، عصاره درمنه کوهی به صورت وابسته به دوز در غلظت های ۵۰-۲۰۰ میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$).



شکل ۹. مقایسه میزان ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره آویشن شیرازی و داروی پیریمتامین در سلول های هلا آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل. C= کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت) =Pyr= پیریمتامین (۱μg/ml)؛ Zata= آویشن شیرازی در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ μg/ml، $P<0.001$ ***، مقایسه گروه ها با کنترل؛ $P<0.001$ °°°، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره آویشن شیرازی با داروی پیریمتامین.

همانطور که در شکل ۹ نشان داده شده است، عصاره آویشن شیرازی به صورت وابسته به دوز در غلظت های ۵۰-۲۰۰ میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$).



شکل ۱۰. مقایسه میزان ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره سرخارگل و داروی پیریمتامین در سلول های هلا آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلازما در مقایسه با کنترل. C= کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت) Pyr= پیریمتامین (۱ μg/ml)؛ Echi= سرخارگل در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ μg/ml، *** $P<0.001$ ، مقایسه گروه ها با کنترل؛ $P<0.001$ ، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره سرخارگل با داروی پیریمتامین.

همانطور که در شکل ۹ نشان داده شده است، عصاره سرخارگل به صورت وابسته به دوز در غلظت های ۵۰-۲۰۰ میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P<0.001$).

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر در محیط عاری از سلول، عصاره های مورد، درمنه کوهی، آویشن شیرازی، سرخارگل و زردچوبه بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما اثر کشندگی داشتند، منتهی اثر کشندگی عصاره های مورد، درمنه کوهی، آویشن شیرازی، سرخارگل از زردچوبه و فلفل بیشتر بود. فلفل سیاه اثر ضد توکسوپلازمایی ناچیز آنهم در بالاترین غلظت نشان داد. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که انواع عصاره های گیاهی با درجات مختلف دارای اثرات مهاری یا کشندگی بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما می باشند. به طوری که در مطالعه Youn و همکاران (۲۰۰۳) فعالیت ضد توکسوپلازمایی ۵ عصاره الکلی گیاهی شامل، *Sophora flavescens* (گونه ای از تلخ بیان)، *Pulsatilla koreana* (گونه ای از بادلرزان)، *Torilis japonica* (گونه ای از هویج)، *Ulmus macrocarpa* (گونه ای از نارون)، *Sinomenium acutum* بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای و نئوسپورا کانینوم در مقایسه با سولفادیازین در محیط کشت سلولی ارزیابی شد که عصاره های *S. flavescence*, *T. Japonica* مهارکننده های بهتری برای هر دو انگل بودند (۶۶).

در مطالعه Jones-Brando و همکاران (۲۰۰۶) چهار تا از مشتقات جدید آرتیمی سینین درمنه (Artemisinin) اثر مهاری بر توکسوپلازما داشتند و اثر مهاری یکی از مشتقات حداقل دو برابر کمتر از بقیه بود (۶۷). در مطالعه Choi و همکاران (۲۰۰۸) ۲ تا از ۱۵ عصاره متانولی مورد مطالعه شامل عصاره های زنجبیل (*Zingiber officinale*) و تلخ بیان (*Sophora flavescens* Aiton) فعالیت ضد توکسوپلازمایی قوی نشان دادند (۶۸). در مطالعه Jiang و همکاران (۲۰۰۸) اولئورپین (*Oleuropein*) جدا شده از گیاه زبان گنجشک (*Fraxinus rhychophylla*) اثر ضد توکسوپلازما خوبی در *in vitro* نشان داد. به طوری که selectivity اولئورپین (۸/۹) به مراتب از سولفادیازین (۳/۸) و پریمتامین (۲/۵) بیشتر

بود(۶۹). در مطالعه Kavitha و همکاران (۲۰۱۲) ۲ تا از ۴ فراکشن عصاره ریشه گیاه *Eurycoma longifolia jack* اثر ضد توکسوپلاسمایی قویتری داشتند(۷۴). در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره اتری گیاه جینکو (*Ginkgo biloba sarcotestas*) به نام *GAS* (ginkgolic acid) در *in vitro* در محیط کشت سلولی *human foreskin fibroblast (HFF)* ارزیابی شد. اثر *GAS* در مقایسه با آزیترومایسین در غلظت های ۳/۱۳ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بررسی شد. در این مطالعه غلظت ایمن آزیترومایسین (میزان تکثیر ۹۰٪) برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۱۶۷/۱ و ۱۱۵/۲ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. توکسیسیته *GAS* برای سلول های *HFF* کمتر از آزیترومایسین بود. به طوری که غلظت *GAS* برای میزان تکثیر ۹۰٪ بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب غلظت های ۱۷۲ و ۱۵۴/۶ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. در این مطالعه از $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ و $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ برای ارزیابی *DNA* توکسوپلازما و سنتز پروتئین استفاده شد. *GAS* قادر بود در تمامی غلظت ها هم سنتز *DNA* و هم سنتز پروتئین توکسوپلازما را در روش وابسته به زمان مهار کند(۷۳).

اثرات آنتی بیوتیکی عصاره های گیاهی مربوط به ترکیبات موثره ای است که در آنها وجود دارد. به طور مثال ترکیبات اصلی انواع *Artemisia* شامل ترپنوئید ها، فلاونوئید ها، کومارین ها، کافئولکوائینیک اسید و استرول ها است و به عنوان یک منبع مهم ترکیبات بیولوژیک در تهیه حشره کش ها، داروی ضد مالاریا، قارچ کش ها و ضد باکتری ها استفاده می شود. آرتیمی سینین (*Artemisinin*) که یک داروی بسیار موثر ضد مالاریاست منشاء گیاهی دارد و از گونه *A. annua* بدست آمده است (۷۶). *Kiderlen* و همکاران در تحقیقی به نقش بره موم در کشتن آماسیگوت های لیشمانیا دونوانی از طریق آزاد شدن اسید نیتریک و فاکتور نکروز دهنده

تومور از ماکروفاژها در *In-vitro* اشاره کردند (۷۷). فلفل سیاه (*piper nigrum*) سالهای متمادی به عنوان ادویه غذا و همچنین به عنوان داروی گیاهی قابل توجه است در مطالعه *zarai* و همکاران ۲۰۱۳ از عصاره اتانولی فلفل سیاه ترکیب مهم *piperine* شناسایی شد. *piperic acid* از هیدرولیز قلیایی *piperine* سنتز شد. در این بررسی نشان داده شده است که ترکیبات *piperine* و *piperic acid* می توانند به عنوان آنتی آکسیدان و آنتی باکتریال در سلامت انسان و نگه داری مواد غذایی مورد استفاده قرار بگیرند (۷۸). در سال ۲۰۱۱، *Tariku* و همکاران گزارش کردند که افسنتین در غلظت های مناسب دارای خاصیت قوی ضد لیشمانیایی است (۵۹). در مطالعه *Aleksic* و همکاران در گل گیاه مورد، از دسته ترپنها، لیمونن (*Limonene*) به عنوان ضد میکروب، گرماکرین دی (*Germacrene-D*) در عرق این گیاه به عنوان ضد ویروس می باشند. از دسته ترپنوئیدها، لینالول (*linalool*)، میرتنول (*Myrtenole*) و ۱/۸-سینئول (1/8-*cineole*) به عنوان ضد باکتری می باشند. از دسته فنیل پروپانوئیدها، متیلئوگنول (*Methyleugenol*) در گل این گیاه به عنوان آنتی اکسیدان و ضد میکروب می باشد (۳۴). در مطالعه *Patrícia* و همکاران (۲۰۰۵) در برزیل اثرات ضد لیشمانیایی ۱۹ عصاره گیاهی از جمله بومادران و فلفل بر روی انگل لیشمانیا آمازونینسیس و تریپانوزوما کروزلی به صورت *in vitro* ارزیابی شد. درصد مهار رشد عصاره این گیاهان از ۴۹/۵٪ تا ۹۹٪ متفاوت بود (۵۸). در بررسی اصغری و همکاران ترکیبات اصلی موجود در روغن فرار دانه درمنه کوهی شامل: دکان (*Decane*)، پاراسیمن (*Para-cymene*)، ۱/۸-سینئول (1/8-*cineol*)، لینالول (*Linalool*)، بورنئول (*Borneol*) و... بود که این مواد موثره، تاثیر قابل توجهی بر باکتری های اشرشیاکلی (*Escherichia coli*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و لیستریا مونوسیتوژنز (*listeria monocytogenes*) داشتند (۳۶). در مطالعه *Gubta* و همکاران در سال ۲۰۱۵ آنالیز فیتوشیمیایی عصاره

زردچوبه فعالیت ضد میکروبی نشان داد عصاره زردچوبه شامل آلکالوئیدها، تانن ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها و کربوهیدرات ها است. همچنین در این مطالعه تست حساسیت ضد میکروبی فراکشن های مختلف عصاره ریزوم گیاه زردچوبه از قبیل Petroleum، methanol، benzene، chloroform و aqueous اثر مهاری بر باکتری S. aureus ATCC 6571 و همچنین ایزوله های دیگر این باکتری نشان دادند (۷۹). در مطالعه Akram و همکاران در سال ۲۰۱۰ کورکومین که یکی از ماده موثره های گیاه زردچوبه است که فعالیت آنتی اکسیدان، آنتی ویروس، ضد التهاب و ضد قارچ نشان داد. همچنین کورکومین اثرات ضد التهابی را با مهار تعدادی از مولکول هایی که در التهاب نقش دارند، نشان می دهد. همچنین در این مطالعه بررسی شد که کورکومین اثرات سمی بر روی انسان ندارد (۸۰). در مطالعه Cordell و همکاران نشان داده شده است که آلکالوئیدها و فلاونوئیدها ترکیبات اصلی ضد میکروبی در گیاهان هستند (۸۱). در مطالعه هدایتی و همکاران (۲۰۱۳) $64-120 \mu\text{l/ml}$ از اسانس گیاه مورد برای ۳۰ ایزوله *Porphyromonas gingivalis* استفاده شد و غلظت های MIC50 و MIC90 از اسانس گیاه مورد بر ضد این باکتری به ترتیب برابر بود $8 \mu\text{l/ml}$ -۸. ۱. این نتایج نشان می دهد که اسانس گیاه مورد اثرات ضد میکروبی بر علیه (*P. gingivalis*) دارد (۸۲). در تحقیق شریفی فر و همکاران ۲۰۰۷ مشخص گردید که Essensial oil (EO) گیاه آویشن شیرازی دارای فعالیت آنتی باکتریال و آنتی اکسیدان است. نتایج تست آنتی باکتریال نشان می دهد که Essensial oil (EO) این گیاه به طور قابل توجهی رشد میکروارگانیسم ها به ویژه گرم منفی ها را مهار می کند. همچنین فراکشن های قطبی از عصاره متانولی گیاه اثرات ضد میکروبی بر باکتری های گرم مثبت دارد و فراکشن های غیر قطبی اثراتی شبیه به Essensial oil دارند. همچنین فراکشن های عصاره متانولی قادر به کاهش رادیکال های آزاد هستند. در کل ۲۵ ترکیب (۹۹/۷۸٪) Essensial oil آویشن شناسایی شده است. تیمول (Thymol)،

کارواکرو (Carvacrol)، پاراسیمن (Para-cymene)، گاما ترپین (γ-terpinene)، بتاکاریوفیلن (β-caryophyllene) از ترکیبات اصلی Essensial oil آویشن شیرازی می باشند. نتایج این مطالعه نشان می دهد که اسانس و عصاره متانولی این گیاه اثرات آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی دارند (۸۳). در مطالعه ناطق پور و همکاران در سال ۱۳۸۷ سرخارگل از داروهای تقویت کننده سیستم دفاعی بدن می باشد. تحقیقات جدید نشان دهنده این مطلب است که تأثیر سرخارگل در تقویت سیستم دفاعی بدن مربوط به ترکیبات پلی ساکارییدی گیاه مانند اکیناسن (Echinacein) و اکیناکوزید (Echinacoside) و ترکیبات آلکیل آمیدی آن می باشد (۴۹). در بررسی اثر عصاره فلفل سیاه بر آنزیم DNase استافیلوکوک اورئوس توسط زرین قلم مقدم و همکاران ۱۳۸۶ برخی از ترکیبات ضد میکروبی استخراج شد که عبارتند از: ترپین (Terpinene)، بتاپین (β-pinene)، آلفا پین (α-pinene)، لینالئول (linaleol) و ترپینئول (Terpineol) (۴۵). اولته و همکاران اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در ملکول اجزای اسانس مانند کارواکرو، تیمول، سایمن متول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنها بسیار مهم است (۸۴). در مطالعه Stanisavljevic و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده شد که عصاره سرخارگل (Echinacea purpurea L) فعالیت آنتی میکروبیال بر ضد ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا آلبیکنس (با قطر زیاد هاله عدم رشد) دارد و برای آسپرژیلوس نایجر هاله عدم رشد دیده نشد (۸۵). در مطالعه ساجد و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که روغن فرار آویشن شیرازی شامل مقدار قابل توجهی از تیمول (Thymol) و کارواکرو (Carvacrol) است که به عنوان عامل ضد میکروب و ضد قارچ به خوبی شناخته شده اند (۴۶). در مطالعه دهقانی بیدگلی و همکاران ۱۵ ترکیب که ۹۸/۹٪ Essensial oil آویشن شیرازی را تشکیل می دهند، شناسایی شدند. ۶۴٪ از ترکیبات اصلی تشکیل دهنده Essensial oil عبارتند از: Lavandulyl acetate(25.7%)، Geranyl acetate(12.2%)،

Trans- β -ocimene(8.3%)، P-cymene(6.8%) و γ -terpinene(5.7%) که در این مطالعه

Essensial oil آویشن شیرازی فعالیت آنتی باکتریال قابل توجهی بر علیه میکروارگانیسم ها نشان داد(۸۶).

در مطالعه پروین و همکاران (۲۰۱۳) ترکیبات شیمیایی Essensial oil گیاه زردچوبه با روش گاز

کروماتوگرافی شناسایی شد. که در این روش ۲۵ ترکیب نشان داده شده است که از بین این تعداد ۹ ترکیب

شناسایی شد. (10.27%) eucalyptol ترکیب اصلی تشکیل دهنده Essensial oil بوده و بقیه ترکیبات

عبارتند از: α -pinene(1.50%)، β -phellandrene(2.49%)، β -pinene(3.57%)

limonene(2.73%)، 1,3,8-p-menthatriene(1.76%)، ascaridole epoxide(1.42%)، 2-

methyilisoboneol(2.92%)، 5-isopropyl-6-methyl-hepta-3, dien-2-ol(2.07%)

فعالیت آنتی باکتریال برگ زردچوبه با روش دیسک دیفیوژن بر ضد پاتوژن های مختلف انسانی شامل ۸ گونه

قارچی و ۵ گونه باکتریایی مشخص گردید. نتایج ارزیابی آنتی میکروبیال نشان داد که Essensial oil برگ

گیاه زردچوبه اثر مهاری قابل توجهی بر ضد ارگانیسم های مورد آزمایش دارد (۸۷). گیاه آرتمیسیا

چامائملیفولیا (A. chamaemelifolia) گونه ای از جنس درمنه است که در مطالعه قاسمی پیربالتی و

همکاران در سال ۲۰۱۳ Essensial oil این گیاه برای فعالیت آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی مورد آزمایش

قرار گرفت. ترکیبات اصلی Essensial oil این گونه درمنه شامل 1,8-cineole، Artemisia ketone،

chrysanthenone، camphor، borneol، davanone، E-davanone و α -bisabolol می باشد.

Essensial oil گیاه A. chamaemelifolia فعالیت آنتی باکتریال قابل توجهی در مقایسه با آنتی بیوتیک

استاندارد (ampicilline) نشان داد ولی فعالیت آنتی اکسیدانی ضعیفی داشت(۸۸). با توجه به مطالعات انجام

شده و بررسی اثر آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی به نظر می رسد که این فراکشن ها می توانند اثر کشندگی یا مهاری روی تاکی زوئیت انگل توکسوپلازما داشته باشند.

در مطالعه حاضر برای تایید ۱۰۰٪ اثر کشندگی عصاره ها بر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما از روش زیست سنجی در موش استفاده شد. به طور معمول برای نشان دادن اثر کشندگی عصاره ها و یا داروها بر تاکی زوئیت ها از رنگ آمیزی با رنگ تریپان بلو و یا متیلین بلو انجام می شود. با رنگ آمیزی اولی تاکی زوئیت های زنده و با دومی تاکی زوئیت های مرده رنگ می گیرند. استفاده از روش زیست سنجی در موش در طراحی اولیه مطالعه ما لحاظ نشده بود ولی مشاهداتی که طی یک تجربه جداگانه بدست آمد، ما را بر آن داشت که از این روش برای تایید اثر کشندگی عصاره ها به روش رنگ آمیزی استفاده کنیم. در این تجربه تاکی زوئیت ها با یکی از عصاره های گیاهی (غیر از عصاره های مورد مطالعه) مجاورت داده شدند و پس از رنگ آمیزی با متیلین بلو تمامی تاکی زوئیت ها بدون رنگ باقی ماندند که دلالت بر مرده بودن آنها داشت ولی ساختار میکروسکوپی آنها محفوظ باقی ماند که دلالت بر زنده بودن آنها داشت. بنابراین چنین فرض شد که ممکن است برخی عصاره های گیاهی بر رنگ پذیری تاکی زوئیت ها اثر داشته باشند. به همین جهت به منظور مخدوش نشدن نتایج مطالعه حاضر از روش زیست سنجی در موش به عنوان یک روش تاییدی استفاده شد. با توجه به محدودیت های اجرایی، در مطالعه حاضر تنها در مواردی از روش زیست سنجی استفاده شد که به روش رنگ آمیزی با متیلین بلو ۱۰۰٪ تاکی زوئیت ها مرده تشخیص داده شدند. در روش زیست سنجی، اگر یک تاکی زوئیت نیز زنده مانده باشد، قادر است در عرض کمتر از ۲ هفته موش را بکشد. در مطالعه ما

تمامی موش هایی که تحت تجربه زیست سنجی بودند، تا یک ماه تحت نظر بودند و تماماً زنده باقی ماندند که موید ۱۰۰٪ کشته شدن تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها بود.

یکی از کاربردهای احتمالی عصاره های گیاهان دارویی با اثر ضد توکسوپلاسمایی، استفاده از آنها در پیشگیری از توکسوپلاسموز مادرزادی و فعال شدن مجدد توکسوپلاسم در بیماران با اختلال یا تضعیف ایمنی است. جنین مادران سرونکاتیو توکسوپلاسم، مبتلایان به ایدز و افراد تحت درمان داروهای سرکوب کننده ایمنی گروه های در معرض خطر بالای توکسوپلاسموز می باشند. پیشگیری از توکسوپلاسموز در این افراد بسیار اهمیت دارد. در حال حاضر از داروهای سنتتیک برای این منظور استفاده می شود که عوارض جانبی مهمترین عامل محدود کننده استفاده از این داروهاست. به نظر می رسد که فراورده های گیاهی با اثر ضد توکسوپلاسمایی می توانند جایگزین مناسب داروهای سنتتیک برای پیشگیری از توکسوپلاسموز در این افراد باشد. مطالعه خوشزبان و همکاران نشان داد که تجویز خوراکی عصاره سیر سبب افزایش بقاء و کاهش فراوانی انگل موش های BALB/c تلقیح شده با سویه RH در بافت های آنها شد (۶۵). مطالعات پیشگیری کننده توکسوپلاسموز با استفاده از فراکشن های عصاره های با اثرات ضد توکسوپلاسمایی می تواند روشن کننده این نقش احتمالی عصاره های گیاهی باشد.

نتیجه گیری:

از مطالعه حاضر نتیجه گیری می شود که عصاره های مورد، درمنه کوهی، آویشن شیرازی، سرخارگل و زردچوبه اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها توکسو پلاسم گوندی ای داشتند. این اثر برای مورد، درمنه کوهی،

آویشن شیرازی، سرخارگل بیشتر بود. اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها وابسته به دوز بود تا وابسته به مدت زمان انکوباسیون. همچنین اثر بخشی عصاره گیاهان مورد مطالعه در مقایسه با داروی پیریمتامین به مراتب کمتر بود.

پیشنهادهات:

۱. مطالعات تکمیلی با استفاده از فراکشن عصاره های مورد، آویشن شیرازی، درمنه کوهی و سرخارگل که دارای اثر بخشی بیشتری بودند، انجام گیرد.
۲. مطالعات *In vivo* اثر بخشی عصاره های مورد، آویشن شیرازی، درمنه کوهی و سرخارگل با استفاده از سویه های ویرولان و غیر ویرولان توکسوپلازما انجام گیرد.

References

1. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2010; p: 3495-526.
2. Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and public health*. 2010; 57: 1-7.
3. John C. Boothroyd. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *International Journal for Parasitology*. 2009; 39: 935–946. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.003
4. Larry S, Roberts John, Janovy JR, Gerald D, Schmidt, Larry S. *Roberts' foundations of parasitology*. McGraw-Hill Companies, Inc, New York. 2009; p: 43-60.
5. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical microbiology review*. 1998; 11: 267–299.
6. Hill D and Dubey J. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection*. 2002; 8: 634-640.
7. Chinchilla M, Ruiz A. Cockroaches as possible transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Journal of Parasitology*. 1976; 62: 140-2.
8. Kawashima T, Kawabata M, Barzaga N, Matsuda H, Konishi E. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* among urban and rural residents in the Philippines. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2000; 31: 742-746.
9. Meng QF, You HL, Zhou N, Dong W, Wang WL, Wang WL, Cong W. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and associated risk factors among children in Shandong and Jilin provinces, China. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015; 30: 33-35.

10. Xiao Y, Yin J, Jiang N, Xiang M, Hao L, Lu H, Sang H, Liu X, Xu H, Ankarklev J, Lindh J, Chen Q. Seroepidemiology of human *Toxoplasma gondii* infection in China. *BioMe Central infectious diseases*.2010; 10: 4. doi: 10.1186/1471-2334-10-4.
11. Gyang VP, Akinwale OP, Lee YL, Chuang TW, Orok A, Ajibaye O, Liao CW, Cheng PC, Chou CM, Huang YC, Fan KH, Fan CK. *Toxoplasma gondii* infection: seroprevalence and associated risk factors among primary schoolchildren in Lagos City, Southern Nigeria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015; 48: 56-63.
12. Agmas B, Tesfaye R, Koye DN. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors among pregnant women in Debre Tabor, Northwest Ethiopi. *BioMed Central Research Notes*. 2015; 8: 107. doi: 10.1186/s13104-015-1083-2.
13. Fromont EG, Riche B, and Rabilloud M. *Toxoplasma* seroprevalence in a rural population in France: detection of a household effect. *BioMed Central Infectious Diseases*. 2009; 9: 76. doi:10.1186/1471-2334-9-76.
14. Cong W, Dong W, Bai L, Wang XY, Ni XT, Qian AD, Zhu XQ. Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric patients: a case-control study in eastern China. *Epidemiology and Infection*. 2015; 17: 1-7.
15. Abu EK, Boampong JN, Ayi I, Gharthey-Kwansah G, Afoakwah R, Nsiah P, Blay E. Infection risk factors associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in a population-based study in the Central Region, Ghana. *Epidemiology and Infection*. 2014; 6: 1-9.
16. Siddiqui N, Shujatullah F, Khan HM, Rabbani T, Khan PA. IgG avidity antibodies against *Toxoplasma gondii* in high risk females of reproductive age group in India. *Korean Journal of Parasitology*. 2014; 52: 487-91.
17. Sarkari B, Shafiei R, Zare M, Sohrabpour S, Kasraian L. Seroprevalence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection among blood donors in southern Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2014; 8: 543-547.

18. Mahmoudvand H, Dezaki ES, Soleimani S, Baneshi MR, Kheirandish F, Ezatpour B, Zia-ali N. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among healthy blood donors in southeast of Iran. *Parasite immunology*. 2015; 37: 362-7
19. Yad Yad MJ, Jomehzadeh N, Jafar Sameri M and Noorshahi N. Seroprevalence of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies Among Pregnant Woman in South Khuzestan, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014; 7: e9998. doi: 10.5812/jjm.9998.
20. Hashemi HJ, Saraei M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in unmarried women in Qazvin, Islamic Republic of Iran. 2010; 16: 24-8.
21. Saki J, Mohammadpour N, Moramezi F, Khademvatan S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women who have aborted in comparison with the women with normal delivery in Ahvaz, southwest of Iran. *Scientific World Journal*. 2015: 764369. doi: 10.1155/2015/764369.
22. Fallah E, Rasuli A, Shahbazi A, Ghojazadeh M, Khanmohammadi M, Hamzavi F, Roshanaei R. Seroprevalence of *Toxoplasma Gondii* Infection among High School Girls in Ajabshir from East Azarbaijan Province, Iran. *Journal of caring sciences*. 2014; 3: 205. doi: 10.5681/jcs.2014.022. eCollection 2014.
23. Jafari R, Sadaghian M, Safari M. seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and related risk factors in Tabriz City, Iran, 2008. *Journal of research in health sciences*. 2012; 12: 119-121.
24. Abdi J, Shojae S, Mirzaee A, Keshavarz H. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Ilam province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2008; 3: 34-37.
25. Hamidi M, Khulojini M, Azizian R, Bashiri H, Ahanchian A, Babanejad M, Khayat-Salighehdar H, Ahmadi N. Seroprevalence of Toxoplasmosis among Women Referring to Shahid Beheshti Hospital, Hamadan, Iran. *Novelty in Biomedicine*. 2015; 3: 1-5.

26. Daryani A, Sarvi S, Aarabi M, Mizani A, Ahmadpour E, Shokri A, Rahimi M T, Sharif M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Iranian general population: A systematic review and meta-analysis. *Acta tropica*. 2014; 137: 185-194.

27. Vidigal PV, Santos DV, Castro FC, Couto JC, Vitor RW, Brasileiro Filho G. Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35: 1-6.

28. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00205>

29. Chang HR, Pechère JC. In vitro effects of four macrolides (roxithromycin, spiramycin, azithromycin [CP-62,993], and A-56268) on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32(4): 524-9.

30. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*. 2012; 6: 1.

۳۱. زرگری ع. گیاهان داروئی، جلد دوم، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۰، شماره انتشار ۱/۱۸۱۰ صفحات ۹-۵.

۳۲. صمصام شریعت ه. تجزیه و شناسایی مواد دارویی گیاهی به روش میکروسکوپی و کروماتوگرافی. چاپخانه فرهنگ معاصر.

چاپ اول، ۱۳۸۲.

33. <http://www.darooyab.ir/HerbalDrug.aspx>.

34. Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological research*. 2014; 169: 240-254.

35. Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S, Nasery F. Antibacterial effect of *Myrtus communis* hydro-alcoholic extract on pathogenic bacteria. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2013; 15: 19-24.

36. Asghari Gh, Jalali M, Sadoughi E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from the seeds of *Artemisia aucheri* Boiss. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2012; 7: 11-5.

37. Mahboubi M, Ghazian Bidgoli F. Biological activity of essential oil from aerial parts of *Artemisia aucheri* Boiss. from Iran. Herba Polonica. 2009; 55: 96-104.

38. Willcox, Merlin L, Bodeker G. Traditional herbal medicines for malaria. British Medical Journal. 2004; 7475: 1156-1159. doi: 10.1136/bmj.329.7475.1156

۳۹. فلاح حسینی ح، زحمتکش م، حقیقی م. مروری بر کاربرد گیاه زردچوبه (*Curcuma longa* L.) در طب سنتی و مدرن. ۱۵-۱.

40. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy reviews. 2012; 6: 1-5. doi: 10.4103/0973-7847.95849.

۴۱. ایزدی ز، سروش زاده ع، مدرس ثانوی ع، اثنی عشری م، داودی پ. بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه سرخارگل (*Echinaceae purpurea* L.) و شناسایی ترکیبهای شیمیایی آن. فصلنامه طب جنوب، پژوهشکده زیست، پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، سال ۱۳۹۳؛ دوره ۱۷، شماره ۱: ۵۸-۶۹.

42. Zengqi Li, Tiexin T, Shejian L, Xiping N, Mei B, Hong W. The synthesis and storage sites of phenolic compounds in the root and rhizome of *Echinacea purpurea*. American Journal of Plant Sciences. 2012; 3: 551-558. doi:10.4236/ajps.2012.34066

۴۳. حاجی مهدی پور ه، خانوی م، شکرچی م، عابدی ز، پیرعلی همدانی م. بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل. ۱۴۵-۱۵۲.

44. Mehmood MH, Anwarul HG. Pharmacological basis for the medicinal use of black pepper and piperine in gastrointestinal disorders. Journal of medicinal food. 2010; 13: 1086-1096. doi: 10.1089/jmf.2010.1065.

۴۵. زرین قلم مقدم م، ستاری م، زرین قلم مقدم ج؛ رضازاده ش. اثر عصاره الکلی فلفل سیاه، قرمز و آویشن شیرازی بر مهار

آنزیم DNase استافیلوکوکوس اورئوس. سال ۱۳۸۶؛ ۱۷-۲۱.

46. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. *Zataria multiflora* Boiss.(Shirazi thyme) an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *Journal of ethnopharmacology*. 2013; 145: 686-698.

47. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999; 12: 564-582.

۴۸. شهابی س، ایازی روزبهانی ف، کمالی نژاد م، ابدی ع. بررسی اثر کشندگی عصاره و اسانس گیاه زنیان بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی، زمستان ۱۳۸۷؛ شماره ۴: ۳۰۳-۳۰۷.

۴۹. ناطق پور م، میاهی پور ا، ادریسیان غ، سوری ع، متولی حقی ا. تاثیر عصاره الکلی گیاه گلدر بر پلاسمودیوم برگئی در موش سفید آزمایشگاهی (سوری) و مقایسه آن با اثر کلروکین. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، بهار ۱۳۸۷؛ شماره ۱: ۵۷-۶۲.

۵۰. براتی م، شریفی ا، شریفی فر ف. بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ سنجی به صورت برون تنی (in vitro). مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سال ۱۳۸۸؛ شماره ۱: ۳۲-۴۱.

۵۱. سرشتی م، یوسفی دارانی ح، زبردست ن، رفیعان م، منوچهری نائینی ک، یوسفی ح. تاثیر عصاره آبی و اتانولی سرشاخه های هوایی گیاه چای کوهی بر تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت. فصلنامه گیاهان دارویی، زمستان ۱۳۹۰؛ شماره ۸: ۱۵۹-۱۶۵.

۵۲. خلیلی دهکردی ب، رفیعان م، حجازی ح، یوسفی ح، یکتائیان ن، شیرانی بیدابادی ل. بررسی تاثیر عصاره های گیاهی افسنتین، بومادران و برگ گردو بر انگل تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد. شماره ۴، بهمن ۱۳۸۹: ۶۲-۶۹.

۵۳. سوزنگر ن، جدی ف، رائق ص، خرمی س، ارزمانی ک. اثر گیاه ابوخلسا و بومادران بر روی لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، پاییز ۱۳۹۱؛ ۴ (۳): ۳۲۹-۳۳۳.

۵۴. براتی م، شریفی ا، شریفی فر ف. بررسی تاثیر ضد لیشمانیایی عصاره های درمنه کوهی، آنغوره و قوزه پنبه بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، پاییز ۱۳۸۹؛ شماره ۳: ۱۶۶-۱۷۲.

۵۵. محرابی م، صدرایی ج، غفاری ف رف. بررسی مقایسه ای تاثیر قرص سیر و عصاره الکلی ذغال اخته بر روی اووسیست کریپتوسپوریدیوم پارووم در محیط HANK. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، تابستان ۱۳۹۱؛ شماره ۱۷: ۶۰-۵۳.

۵۶. هاشمی م، صعودی س، قائمی ا، سلیمان جاهی ح، محمد حسن ز. بررسی اثر عصاره گیاه سرخارگل (Echinace

Purpurea) بر ازدیاد حساسیت تاخیری و پاسخ تکثیری سلول های طحال در موش BALB/c. فصلنامه پزشکی یاخته ،

زمستان ۱۳۸۶؛ شماره ۴: ۲۶۱-۲۵۴.

57. Astulla A, Zaima K, Matsuno Y, Hirasawa Y, Ekasari W, Widyawaruyanti A, Cholies Zaini N, Morita H. Alkaloids from the seeds of Peganum harmala showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. Journal of Natural Medicines. 2008; 62: 470-2.

58. Patrícia SL, Tatiana ST, Luis GM, Paloma KM. Effects of medicinal plant extracts on growth of Leishmania (L.) amazonensis and Trypanosoma cruzi. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005; 41: 85-94.

59. Tariku Y, Hymete A, Hailu A, Rohloff J. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of Artemisia absinthium and echinops kebericho. Chemistry & Biodiversity Chem Biodivers. 2011; 8: 614-623.

60. Mansour R, Haouas N, Kahla-Nakbi AB, Hammami S, Mighri Z, Mhenni F, Babba H. The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum*. Iranian journal of pharmaceutical research. 2013; 12: 349-355.

61. Ziegler HL, Franzyk H, Sairafianpour M, Tabatabai M, Tehrani MD, Bagherzadeh K, Hägerstrand H, Staerk D, Jaroszewski JW. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. Bioorganic & medicinal chemistry. 2004; 12: 119-27.

62. Vendrametto MC, Santos AO, Nakamura CV, Dias Filho BP, Cortez DA, Ueda-Nakamura T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. Parasitology international. 2010; 59: 154-8.

63. El-Ansary AK, Ahmed SA, Aly SA. Antischistosomal and liver protective effects of *Curcuma longa* extract in *Schistosoma mansoni* infected mice. Indian journal of experimental biology. 2007; 45: 791-801.

64. Mojarab M, Shiravand A, Delazar A, Heshmati Afshar F. Evaluation of in vitro antimalarial activity of different extracts of *Artemisia aucheri* Boiss. and *A. armeniaca* Lam. and fractions of the most potent extracts. Scientific World Journal. 2014; 825370. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/825370>

۶۵. خوش زبان ف، غضنفری ط، غفاری فر ف، شرفی م، قاسمی نیکو س. بررسی اثر سیر بر توکسوپلاسموزیس حاد در مدل موشی. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، تیر ۱۳۸۶؛ شماره ۳: ۲۹۵-۳۰۶.

66. Youn HJ, Lakritz J, Kimc D, Rottinghaus G, Marsh A. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Veterinary Parasitology . 2003; 116: 7-14.

67. Jones-Brand L, D'angel J, Posner G, Yolken R. In Vitro Inhibition of *Toxoplasma gondii* By Four New Derivatives of Artemisinin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 4206-8.

68. Choi W, Jiang M, Chu J. Antiparasitic Effects of *Zingiber Officinale* (Ginger) Extract Against *Toxoplasma Gondii*. *Journal of Applied Biomedicine*. 2013; 11: 15-26.
69. Jiang JH, Jin CM, Kim YC, Kim HS, Park WC, Park H. Anti-toxoplasmosis Effects of Oleuropein Isolated from *Fraxinus rhychophylla*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008; 31: 2273-2276.
70. Chen SX, Wu L, Jiang XG, Feng YY, Cao JP. Anti-*Toxoplasma gondii* activity of GAS in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2008; 118: 503-7.
71. de Oliveira TC, Silva DA, Rostkowska C, Béla SR, Ferro EA, Magalhães PM, Mineo JR. *Toxoplasma gondii*. Effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*. 2009; 122: 233-41.
72. Al-Zanbagi N. In Vivo Effect of Some Home Spices Extracts On The *Toxoplasma Gondii* Tachyzoites. *Journal Of Family & Community Medicine*. 2009; 16: 59-65.
73. Kavitha N, Noordin R, Chan k-L, Sasidharan S. In vitro Anti-*Toxoplasma gondii* Activity of Root Extract/Fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. *BMC Complementar and Alternative Medicine*. 2012; 12: 91. doi: 10.1186/1472-6882-12-91.
74. Johanson JS, Holliman RE. Toxoplasmosis. In: Gillespie SH, Hawkey PM. (editors). *Medical Parasitology: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press Inc.1995; p: 33-59.
75. Meneceur P, Bouldouyre MA, Aubert D, Villena I, Menotti J, Sauvage V, Garin JM, Derouin F. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52: 1269-1277.
76. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharmaceutical Biology*. 2011; 49: 101-9.

77. Kiderlen AF, Kayser O, Ferreira D, Kolodziej H. killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages in vitro *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*. 2001; 56: 444-54.
78. Zarai Z, Boujelbene E, Ben Salem N, Gargouri Y, Sayari A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *Lwt-Food science and technology*. 2013; 50: 634-641.
79. Gupta A, Mahajan S, Sharma R. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology Reports*. 2015; 6: 51-55.
80. Akram M, Ahmed AS, KHAN U, ABDUL H, Mohiuddin E, and Asif M. *Curcuma longa* and curcumin: a review article. *Romanian Journal of Biology - Plant Biology*. 2010; 55: 65-70.
81. Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery, *Phytother. Res*. 2001; 15: 183–205.
82. Hedayati A, Khosropanah H, Bazargani A, Abed M, Emami A. Assessing the Antimicrobial Effect of the Essential Oil of *Myrtus communis* on the Clinical Isolates of *Porphyromonas gingivalis*: An in vitro Study. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2013; 8: 165–168.
83. Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control*. 2007; 18: 800-805.
84. Ultee A1, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68: 1561-8.

85. Stanisavljević I, Stojičević S, Veličković D, Veljković V, and Lazić M. Antioxidant and antimicrobial activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2009; 17: 478-483.
86. Dehghani Bidgoli R, Ebrahimabadi AH, Heshmati GH, Pessarakli M. Antioxidant and Antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Artemisia aucheri* Boiss. from Iran. *Current Research in Chemistry*. 2013; 5: 1-10. doi: 10.3923/crc.2013.1.10.
87. Parveen Z, Nawaz S, Siddique S, and Shahzad K. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Curcuma longa* L. Kasur variety. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2013; 75: 117-22. doi: 10.4103/0250-474X.113544.
88. Pirbalouti Ghasemi A, Firoznezhad M, Craker L, Akbarzadeh M. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23: 861-869. doi:10.1590/S0102-695X2013000600002.

Evaluation of anti-Toxoplasma effects of herbal extracts of *Myrtus communis*, *Curcuma longa*, *Artemisia aucheri* Boiss, *Zataria Multiflora* boiss, *Echinacea purpurea* and *piper nigrum* in vitro

Abstract

Objective (s): Achieving an anti-Toxoplasma product with high efficacy and low side effects is a priority in research on *Toxoplasma gondii*. Herbal products may be a suitable candidate for this purpose. The present study was performed to evaluate anti-Toxoplasma effects of *Myrtus communis*, *Curcuma longa*, *Artemisia aucheri* boiss, *Echinacea purpurea*, *Zataria multiflora* Boiss and *piper nigrum* extracts *in vitro*.

Materials and Methods: *T. gondii* RH strain tachyzoites were exposed to these extracts both in cell-free medium and cell culture. Mortality rate of tachyzoites in cell-free medium were determined at concentrations of 200, 100, 50 and 10 mg/ml. In cell culture, EC50 of the extracts were calculated at concentrations of 200, 100 and 50 µg/ml by using of MTT and ELISA reader. Pyrimethamine was used as control. The data were analyzed with one way ANOVA, followed by Tukey's HSD using SPSS software.

Results: In general, all of these extracts demonstrated cidal effects on tachyzoites in cell-free medium. The highest effects belong to *E. purpureac*, *M. communis*, and *A. aucheri* Boiss. *Piper nigrum* extract showed the lowest mortality on *T. gondii*. *E. purpureac* and *Zataria multiflora* Boiss showed lower EC50 and higher selectivity in compared to *Myrtus communis* and *Artemisia aucheri* boiss in cell

culture. Anti- *T. gondii* activity of these extracts were significantly lower than pyrimethamine.

Conclusions: It seems that *E. purpurea* has a strong inhibitory effect on *Toxoplasma* in compared to other four extracts. Therefore, further study on anti-*Toxoplasma* activity of fractions this extract was recommended.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Myrtus communis*, *Curcuma longa*, *Artemisia aucheri* boiss, *Echinacea purpurea*, *Zataria multiflora* Boiss, *Piper nigrum*